

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Informe farmacogenético en tratamiento de cáncer de mama
con tamoxifeno. Aspectos médico-legales**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Enrique Martín-Lunas Aliaga

Director

Fernando Bandrés Moya

Madrid, 2019



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Programa de Doctorado en:

INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS MÉDICO-QUIRÚRGICAS

**Informe farmacogenético en el tratamiento de cáncer de
mama con tamoxifeno. Aspectos médico-legales.**

ENRIQUE MARTÍN-LUNAS ALIAGA

Madrid, 2018



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Programa de Doctorado en:

INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS MÉDICO-QUIRÚRGICAS

**Informe farmacogenético en el tratamiento de cáncer de
mama con tamoxifeno. Aspectos médico-legales.**

Autor: ENRIQUE MARTÍN-LUNAS ALIAGA
Director: FERNANDO BANDRÉS MOYA

Madrid, 2018



D. Fernando Bandrés Moya, Profesor Titular del Departamento de Medicina Legal, Psiquiatría y Anatomía Patológica de la Universidad Complutense de Madrid,

Informa: Que la tesis doctoral presentada por D. Enrique Martín-Lunas Aliaga con el título "Informe farmacogenético en el tratamiento de cáncer de mama con tamoxifeno. Aspectos médico-legales" ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor, en condiciones tan aventajadas que le hacen acreedora al título de Doctor.

Y, para que así conste, firmo el presente en Madrid a veintidós de mayo de dos mil dieciocho.

La mayor ilusión de esta vida es la vida misma.

A mis padres, esposa e hijos.

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Dr. Fernando Bandrés Moya por su enseñanza y compromiso docente, con quien me siento identificado, y al que desde aquí agradezco sus sugerencias e incondicional apoyo sin el cual este trabajo no hubiera sido posible; y como no, pedirle disculpas por no haber acometido la tesis con mayor celeridad. Compaginar trabajo, familia y tesis doctoral no son tareas fáciles de gestionar.

Al Profesor Dr. David Martínez Hernández y a todo el personal del Departamento de Salud Pública y Materno-Infantil, que han participado en la enseñanza del programa de Doctorado de Investigación en Ciencias Médico-Quirúrgicas.

A Luis Chicharro, al que tengo en gran aprecio y cariño, y al que agradezco su importante e incondicional colaboración en el desarrollo de parte de este trabajo.

Al Presidente del Tribunal y titulares nombrados por la Comisión de Doctorado, así como evaluadores, desde este humilde escrito, por su dedicación y disposición para hacer posible la defensa de esta tesis.

A la Dra. María Redondo, mi esposa, por su incondicional apoyo, sagacidad e inteligencia.

A todo el personal del Departamento de Medicina Legal, Psiquiatría y Patología; y como no, mi más sincera gratitud a los Servicios de Biblioteca de la Facultad de Medicina y del Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses, centro este último al que pertenezco, en especial a Alicia quien, gracias a sus conocimientos en bibliometría, me ha permitido llevar a término la búsqueda, organización y clasificación de las publicaciones científicas con mayor facilidad.

A cuantas personas haya conocido en el ejercicio de mi aprendizaje y me han dejado huella en mayor o menor medida. Por ello, desde este amplio aforo, agradezco a todas ellas su apoyo incondicional en toda mi trayectoria profesional y personal. Siempre las tendré presentes.

Por último, agradecer el apoyo de la Cátedra Complutense de Diagnóstico e Innovación Roche/UCM, así como de la Cátedra Complutense de Patología de la Mama Fundación Tejerina/UCM.

AGRADECIMIENTOS.....	ii
ABREVIATURAS	vi
TABLAS	vii
FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	ix
SUMMARY	xix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 ORIGEN DE LA FARMACOGENÉTICA	6
1.2 ORIGEN DEL TAMOXIFENO.....	10
1.3 FARMACOGENÉTICA Y TAMOXIFENO.	15
1.4 METABOLISMO DEL TAMOXIFENO.	19
1.5 POLIMORFISMOS CYP2D6 Y METABOLISMO DEL TAMOXIFENO.	22
1.6 MARCO NORMATIVO. DISPOSICIONES LEGALES EXISTENTES.....	27
1.6.1 MARCO NORMATIVO SOBRE MEDICAMENTOS.	28
1.6.2 MARCO NORMATIVO SOBRE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA: LEY 14/2007.....	35
2. JUSTIFICACIÓN	38
3. HIPÓTESIS.....	42
4. OBJETIVOS.....	44
5. MATERIALES Y MÉTODOS	46
5.1 GRUPOS DE POBLACIÓN ESTUDIADOS	47
5.1.1 POBLACIÓN DE REFERENCIA	47
5.1.2 POBLACIÓN DIANA.....	47
5.1.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.....	47
5.1.4 CÁLCULO TAMAÑO MUESTRAL	48
5.2 CONSENTIMIENTO INFORMADO Y HOJA RECOGIDA DE DATOS	49
5.3 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	49
5.4 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO	50

5.5 CUANTIFICACIÓN ADN GENÓMICO	53
5.6 AMPLIFICACIÓN DEL GEN CYP2D6	54
5.7 ELECTROFORESIS EN MINIGELES DE AGAROSA	58
5.8 PCR ARMS (Amplification Refractory Mutation System) MULTIPLEX.	61
5.9 HPLC-MS/MS EN FASE REVERSA CON GRADIENTE ELUCIÓN	66
5.9.1 REACTIVOS	67
5.9.2 INSTRUMENTACIÓN	67
5.9.3 CALIBRACIÓN, CONTROLES, ESTÁNDARES INTERNOS Y MUESTRAS	68
5.9.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	70
ANEXO I. HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE	71
ANEXO II. CONSENTIMIENTO INFORMADO	73
ANEXO III. HOJA RECOGIDA DE DATOS	74
6. RESULTADOS	75
ANEXO IV. DATOS EXPERIMENTALES	91
ANEXO V. AGRUPACIÓN GENOTIPOS CYP2D6 vs RANGO DE EDADES	99
ANEXO VI. POBLACIÓN REFERENCIA POR RANGO DE EDADES	100
ANEXO VII. CONCENTRACIÓN TAMOXIFENO Y METABOLITOS vs GENOTIPO CYP2D6....	101
ANEXO VIII. TAMOXIFENO: CONTRASTE MEDIA ACUMULADA vs MEDIA TOTAL	103
7. DISCUSIÓN	105
7.1 DISCUSIÓN SOBRE LA POBLACIÓN DE REFERENCIA ESTUDIADA	106
7.2 DISCUSIÓN SOBRE LA TECNOLOGÍA APORTADA.....	108
7.3 DISCUSIÓN SOBRE LOS POLIMORFISMOS DE LA POBLACIÓN DE REFERENCIA	115
ANEXO IX. DISTRIBUCIÓN ALÉLICA CYP2D6 EN POBLACIÓN CAUCÁSICA EUROPEA.	119
7.4 DISCUSIÓN SOBRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA POBLACIÓN ENFERMA..	121
7.5 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CON LA LITERATURA CIENTÍFICA.....	127
7.6 DISCUSIÓN SOBRE LA ESTRATEGIA PARA EL ESTUDIO DEL TAMOXIFENO	135
ANEXO X. ESTRATEGIA PARA UN ESTUDIO SOBRE TAMOXIFENO	138

7.7 DISCUSIÓN SOBRE CRITERIOS ASISTENCIALES. INFORME FARMACOGENÉTICO...	139
7.8 DISCUSIÓN MÉDICO-LEGAL.....	144
ANEXO X. MODELO INFORME FARMACOGENÉTICO	153
8. CONCLUSIONES.....	156
9. REFERENCIAS.....	161

ABREVIATURAS

ADN: Ácido dextrirribonucleico
EMA: European Medicines Agency
CDER: Center for Drug Evaluation and Research
CBER: Center for Biologics and Research
SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica
ICI: Imperial Chemical Industries
FDA: Food and Drug Administration
RE+: Receptores estrogénicos positivos
ER+: Estrogen Receptor Positive
EBCTCG: Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group
CYP450: Cytochrome Pigment 450
IHGSC: International Human Genome Sequencing Consortium
N-D-TAM: N-desmetil-tamoxifeno
4-OH-TAM: 4-hidroxi-tamoxifeno
TAM: Tamoxifeno
MP: Metabolizador pobre
MI: Metabolizador intermedio
ME: Metabolizador extensivo
MU: Metabolizador ultrarrápido
SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido
CEIC: Comités Éticos de Investigación Clínica
CPMP: Committee for Proprietary Medicinal Products
CHMP: Committee for Medical Products for Human Use
SEFF: Sociedad Española de Farmacogenética y Farmacogenómica
CAM: Comunidad Autónoma de Madrid
BOE: Boletín Oficial del Estado
BOCM: Boletín Oficial de la Comunidad de Madrid
PCR: Polymerase Chain Reaction
ARMS: Amplification Refractory Mutation System
LE: Low Electroendosmosis
GQT: Genetic Quality Tested
TBE: Tampón Tris-Borato-EDTA
SPSS: Statistical Package for the Social Sciences
INE: Instituto Nacional de Estadística
IACR: International Association of Cancer Registries
IARC: International Agency for Research on Cancer
RFLP: Restriction Fragment Length Polimorfism
HPLC-MS/MS: Liquid chromatography–tandem mass spectrometry
CPIC: Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium
AEMPS: Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios
OMC: Organización Médica Colegial

TABLAS

		Página
Tabla 1	Evolución ensayos clínicos relevantes con tamoxifeno 1977-2017	13
Tabla 2	Secuencia nucleotídica primers PCR larga	56
Tabla 3	Secuencia nucleotídica primers PCR ARMs 1 y 2	63
Tabla 4	Niveles TAM y sus metabolitos vs genotipos CYP2D6	90
Tabla 5	Criterios interpretación valores concentración de endoxifeno	129
Tabla 6	Interpretación clínica genotipos CYP2D6	130

FIGURAS

		Página
Figura 1	Retrato de Archivald Edward Garrod	6
Figura 2	Retrato de William Bateson	7
Figura 3	Retrato de James D. Watson y Francis Crick	8
Figura 4	Retrato de Friedric Vogel	10
Figura 5	Retrato de Kary Mullis	15
Figura 6	Publicaciones desde 1989 hasta 2017	17
Figura 7	Cronograma consolidación Farmacogenética	18
Figura 8	Rutas metabólicas tamoxifen	21
Figura 9	Cronograma marco normativo legal	34
Figura 10	Localización citogenética gen CYP2D6 y pseudogenes	54
Figura 11	Localización polimorfismos CYP2D6*3, *4, *5, *6, *9, *10 y *41	57
Figura 12	Electroforesis en gel de agarosade productos PCR ARMS 1 y 2	61
Figura 13	Equipo Magna Pure Compact	65
Figura 14	Equipo autoanalizador LightCycler 480-II PCR RT	65
Figura 15	Equipo HPLC Agilent 1200 series y detector masas Agilent 6410	67
Figura 16	Histograma frecuencias de edades grupo referencia CAM	77
Figura 17	Histograma frecuencias de genotipos grupo referencia CAM	80
Figura 18	Histograma frecuencias alélicas CYP2D6 grupo referencia CAM	116
Figura 19	Histograma frecuencias alélicas CYP2D6 pacientes cáncer mama	122
Figura 20	Histograma niveles endoxifeno vs alelos CYP2D6	126
Figura 21	Esquema justificación de la indicación del informe farmacogenético	143

RESUMEN

1. Introducción

La Farmacogenética, definida como la disciplina que estudia las variaciones en la secuencia de ADN en relación con la respuesta a los fármacos, se ha convertido en un área de gran importancia en la medicina personalizada ⁽¹⁾ a la hora de prescribir un medicamento con mayor seguridad y eficacia. En este sentido, el tamoxifeno es un modelo que estudiar por su elevada variabilidad interindividual en la respuesta al tratamiento y por ser un fármaco de elección en la hormonoterapia del cáncer de mama receptores estrogénicos positivos (RE+).

Según la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) ^a, el cáncer de mama es el cáncer más común en mujeres con una incidencia de 26.370 casos nuevos por año, una prevalencia a cinco años de 104.405 casos y una mortalidad de 6.477 mujeres, de los cuales un 76% de los carcinomas primarios son RE+ y sólo responden a la hormonoterapia con tamoxifeno entre un 55-60% ⁽²⁾. Esta variabilidad en la respuesta al tratamiento a la misma dosis puede ser debida en parte a diferencias genéticas interindividuales.

El tamoxifeno es un profármaco modulador selectivo que requiere ser metabolizado a sus metabolitos primarios N-desmetil-tamoxifeno y 4-hidroxitamoxifeno por varias enzimas CYP450 ⁽³⁾. Además, estos dos metabolitos son metabolizados a endoxifeno por la enzima CYP2D6 en un 100% y 56%, respectivamente ⁽³⁾. El endoxifeno es considerado como el metabolito activo responsable de los efectos antiestrogénicos del tamoxifeno. Por lo tanto, una asociación entre el genotipo y fenotipo metabólico del gen polimórfico CYP2D6 postula que los análisis farmacogenéticos optimizarán el tratamiento.

^a Sociedad Española de Oncología Médica. Las Cifras del Cáncer en España 2017. www.seom.org

El ejercicio de la Farmacogenética en el marco de este modelo de cáncer de mama en tratamiento con tamoxifeno, así como la disposición de la Ley 14/2007 ^b en el ámbito de la Investigación Biomédica que permite el estudio de las diferencias genéticas interindividuales en la respuesta a los fármacos y las interacciones genético ambientales, nos hace intuir que en breve plazo se incorporará paulatinamente a la actividad asistencial un informe farmacogenético, como un modelo innovador a establecer en la historia clínica de la paciente crónica y polimedicada, a fin de evitar un riesgo de tratamiento sub-óptimo y prevenir efectos adversos.

Informe farmacogenético que evidenciará aspectos médico-legales en la información a la paciente, el consentimiento informado y el ejercicio de deliberación, entre otros, para una adecuada toma de decisiones en el marco del ejercicio de una medicina personalizada y de precisión.

2. Hipótesis y objetivos

El estudio biopatológico de las mujeres que padecen cáncer de mama, en tratamiento con tamoxifeno, justifica la necesidad de realizar informes farmacogenéticos, que se incorporen a la historia clínica de la paciente.

Los objetivos propuestos son: identificar en una población femenina de la Comunidad Autónoma de Madrid, la distribución de los polimorfismos del gen CYP2D6 que puedan especialmente implicar una actividad metabólica reducida; estudiar los polimorfismos del gen CYP2D6 en un grupo de pacientes con cáncer de mama en tratamiento con tamoxifeno, así como sus niveles plasmáticos del fármaco y sus metabolitos; proponer una estrategia de análisis farmacogenético del

^b Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica. Boletín Oficial del Estado núm. 159, miércoles 4 julio 2007, pág. 28826-28848.

gen CYP2D6 y niveles plasmáticos de tamoxifeno y sus metabolitos; y por último, proponer un modelo de informe farmacogenético acorde a criterios asistenciales y médico legales.

3. Materiales y métodos

Se realiza un estudio transversal en una población de referencia de la Comunidad Autónoma de Madrid (CAM) a la que se espera extrapolar los resultados genéticos de los polimorfismos CYP2D6 con baja actividad metabólica de 423 mujeres sanas, caucásicas, clasificadas en grupos de edad. Así mismo, previo consentimiento informado, en un subgrupo de 100 mujeres pre y postmenopáusicas de la población con cáncer de mama en hormonoterapia, se estudia los niveles de tamoxifeno y sus metabolitos con respecto a cada uno de los genotipos polimórficos CYP2D6 identificados en la población de referencia.

Para ello, diferentes técnicas instrumentales fueron puestas a punto según disponibilidad de equipos analíticos en el propio laboratorio. El análisis genético fue realizado con los procedimientos comunes en Biología Molecular, como son la extracción, purificación y cuantificación de ADN genómico, así como la preamplificación del gen CYP2D6 sin los pseudogenes CYP2D7 y CYP2D8 ⁽⁴⁾ mediante una PCR larga y su verificación en gel de agarosa. Todo ello, seguido de un análisis genético fundamentado en un sistema multiplex de amplificación refractaria de mutaciones (ARMS: Amplification Refractory Mutation System) ⁽⁵⁾, modificada por nosotros, permitió la identificación en batería de los polimorfismos CYP2D6*3, *4, *5, *6, *9, *10 y *41 de baja actividad metabólica.

En cuanto al análisis cuantitativo del tamoxifeno y sus metabolitos (N-desmetil-tamoxifeno, endoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno), se realizó mediante cromatografía líquida en fase reversa con gradiente de elución acoplada a un espectrómetro de

masas triple cuadrupolo con trampa de iones (HPLC-MS/MS), ampliamente aceptada como técnica de referencia en un entorno de laboratorio clínico ⁽⁶⁾. Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante el software IBM SPSS® Statistics Version 20.

4. Resultados y discusión

El subgrupo de 423 mujeres de la CAM, denominado población de referencia, nos ha servido para estudiar el tipo de variantes genéticas CYP2D6 de baja actividad metabólica y sus frecuencias alélicas en la población asistencial. Consideramos que la frecuencia de cada variante alélica debía ser conocida previamente, ya que no habíamos encontrado en la literatura datos demográficos de mujeres madrileñas sanas en relación con las frecuencias de los polimorfismos CYP2D6 de baja actividad, y en la literatura existen numerosos trabajos ⁽⁶⁻⁸⁾ que han sido tema de controversia.

Para ello, pusimos a punto un método analítico PCR-ARMS para identificar los polimorfismos CYP2D6*3, *4, *5 y *6 como MP, así como los polimorfismos CYP2D6*9, *10 y *41 como MI. La evidencia de los resultados obtenidos nos demostró que este test tiene una gran validez analítica, si bien su aplicación en la práctica clínica puede estar limitada debido a su complejidad y difícil automatización.

Hemos constado la presencia de cada uno de los polimorfismos CYP2D6*3, *4, *5, *6, *9, *10 y *41 en la población de referencia, y calculado sus frecuencias alélicas. Un total de 6.768 reacciones de PCR-ARMS confirmaron la presencia mayoritaria del gen nativo CYP2D6*1 con una frecuencia alélica del 77.6%, seguido del genotipo CYP2D6*4 con un 13.7%. Los genotipos CYP2D6*9, *41, *10 y *3 presentaron frecuencias alélicas del 3.19%, 2.60%, 1.54% y 0.83%, respectivamente. Los genotipos CYP2D6*5 y *6 fueron minoritarios con frecuencias alélicas del 0.24%. Todas ellos

estaban dentro del rango de frecuencias poblacionales aceptadas por el Consorcio Europeo del citocromo P450^c para una población caucásica europea. La suma porcentual de las frecuencias de los alelos *3, *4, *5, *6, *9, *10 y *41 supuso el 22.35% de los alelos totales de la población de referencia. Ninguno de ellos era dependiente de la edad (ANOVA de un factor, $p = 0.276$).

Además, hemos confirmado la importancia de los polimorfismos CYP2D6 en relación con el metabolismo del tamoxifeno, en un estudio sobre un total de 100 casos clínicos de pacientes diagnosticadas de cáncer de mama RE+. El modelo estudiado encuentra reflejo en los trabajos de Madlensky⁽⁹⁾ y Saladores⁽¹⁰⁾. La concentración de endoxifeno en los genotipos nativos CYP2D6*1 fue significativamente mayor que la obtenida en los genotipos MP y MI, incluso en los heterocigotos con un solo alelo polimórfico (Test de Kruskal-Wallis, $p < 0.05$). La concentración de endoxifeno disminuyó de mayor a menor en el siguiente orden alélico *41, *10, *5, *9, *6, *4 y *3. En todos ellos, la concentración estaba muy por debajo del valor de endoxifeno para una óptima supresión tumoral⁽¹¹⁾.

No se observó diferencias intergrupos de polimorfismos CYP2D6 en la concentración de tamoxifeno ($p = 0.099$), por lo que no se le atribuye interés como indicador en la respuesta al tratamiento, pero sí como indicador del cumplimiento terapéutico⁽¹⁰⁾.

La relación metabólica del fármaco con el genotipo CYP2D6 y siguiendo las recomendaciones de Goetz⁽¹²⁾, se propone una estrategia farmacogenética en la práctica clínica. Así mismo, la existencia de razones clínicas de indicación, biotécnicas y la evidencia de criterios asistenciales como son el elevado número de casos de cáncer de mama y su cronicidad en tratamiento con tamoxifeno durante

^c Pharmacogene Variation Consortium en www.pharmvar.org

años, entre otros, además de aspectos médico-legales recogidos en la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica, justifica desde un punto de vista médico ético legal y deontológico, la incorporación del informe farmacogenético en la historia clínica de la paciente como modelo innovador de la asistencia sanitaria, que en virtud de criterios de predicción, afectará en la toma de decisiones y el ejercicio de deliberación interconsulta según se recoge en el Manual de Ética y Deontología Médica.

5. Conclusiones

En relación con el objetivo 1:

Conclusión primera

El estudio de los polimorfismos genéticos del citocromo CYP2D6 en mujeres sanas, así como en pacientes con cáncer de mama, permite identificar a la población mediante estos biomarcadores. Así mismo, hemos detectado polimorfismos compatibles con metabolización anómala del tamoxifeno en el rango de frecuencias poblacionales aceptadas por el Consorcio Europeo del citocromo P450.

Conclusión segunda.

El estudio de los polimorfismos CYP2D6 mediante la técnica PCR ARMS multiplex, modificada por nosotros, permite su uso habitual en medicina clínica, siendo de utilidad diagnóstica.

Los estudios de polimorfismos CYP2D6 con técnicas automatizadas pueden ser más eficaces, pero precisan realizar estudios de coste efectividad y seleccionar un perfil de polimorfismos, antes de que se puedan aplicar en el diagnóstico clínico.

En relación con el objetivo 2:

Conclusión tercera

El estudio de niveles de tamoxifeno y metabolitos (N-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno y endoxifeno) cuantificados mediante técnicas de cromatografía líquida de alta resolución, modificada por nosotros, permite elaborar un informe analítico clínico que permite mejorar el control y seguimiento de las pacientes.

Conclusión cuarta

La asociación entre los resultados de polimorfismos CYP2D6 y la monitorización de los niveles de tamoxifeno y sus metabolitos permite elaborar un informe farmacogenético que posibilitaría detectar precozmente tratamientos sub-óptimos, evitar efectos adversos y detectar alteraciones en el seguimiento terapéutico.

En relación con el objetivo 3:

Conclusión quinta

Con un criterio médico legal, el informe fármacogenético que proponemos está avalado en el artículo 9 de la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica, y puede ser considerado como un informe complementario a la historia clínica, acorde a lo establecido en el artículo 15 de la Ley 41/2002 básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos en materia de información y documentación clínica.

Conclusión sexta

Proponemos que el informe farmacogenético se contemple como una prestación sanitaria innovadora en el marco del artículo 14 de la Ley 11/2017 de Buen Gobierno y Profesionalización de la Gestión de los Centros y Organizaciones Sanitarias del Servicio Madrileño de Salud, así como en el marco de la Ley 16/2003 de cohesión y calidad asistencial del Sistema Nacional de Salud.

En relación con el objetivo 4:

Conclusión séptima

El modelo de trabajo y de informe farmacogenético propuesto en pacientes en tratamiento con tamoxifeno, puede trasladarse a otras situaciones clínicas y terapéuticas vinculadas al análisis de polimorfismos del CYP2D6 con otros grupos farmacológicos, utilizados en terapéutica y dependientes metabólicamente de este citocromo.

Conclusión octava

El informe farmacogenético permite desarrollar un modelo de prestación sanitaria que permite optimizar el tratamiento, evitar y reducir efectos adversos, en el marco del ejercicio profesional de una nueva medicina personalizada y de precisión que se incorpora a los nuevos conceptos de humanización de la asistencia sanitaria.

6. Referencias

1. Hood L. Systems biology and p4 medicine: past, present, and future. Rambam Maimonides Med J. 2013 Apr;4(2): e0012.
2. Vera Álvarez, J.J. Factores Pronóstico del Cáncer de Mama. Boletín Oncológico del Área Sanitaria de Teruel, 2015; noviembre, nº 13.
3. Desta Z, Ward BA, Soukhova NV, Flockhart DA. Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6. J Pharmacol Exp Ther. 2004 Sep;310(3):1062–75.
4. Kimura S, Umeno M, Skoda RC, Meyer UA, Gonzalez FJ. The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene, and a pseudogene. Am J Hum Genet. 1989 Dec; 45(6): 889-904.
5. Roberts, R.L. and Kennedy, M.A. Rapid detection of common cytochrome P450 2D6 alleles in Caucasians. Clinica Chimica Acta, 2006, 366: 348-351.
6. Rae JM. CYP2D6 genotype should not be used to determine endocrine therapy in postmenopausal breast cancer patients. Clin Pharmacol Ther. 2013 Aug;94(2):183-5.
7. Rae JM, Regan M, Leyland-Jones B, Hayes DF, Dowsett M. CYP2D6 genotype should not be used for deciding about tamoxifen therapy in postmenopausal breast cancer. J Clin Oncol. 2013, Jul 20; 31(21): 2753-5.
8. Abraham JE, Maranian MJ, Driver KE, Platte R, Kalmyrzaev B, Baynes C, Luccarini C, Shah M, Ingle S, Greenberg D, Earl HM, Dunning AM, Pharoah PD, Caldas C. CYP2D6 gene variants: association with breast cancer specific survival in a cohort of breast cancer patients from the United Kingdom treated with adjuvant tamoxifen. Breast Cancer Res. 2010; 12(4).

9. Madlensky L, Natarajan L, Tchu S, Pu M, Mortimer J, Flatt SW, et al. Tamoxifen metabolite concentrations, CYP2D6 genotype, and breast cancer outcomes. *Clin Pharmacol Ther.* 2011 May; 89 (5): 718–25
10. Saladores P, Mürdter T, Eccles D, Chowbay B, Zgheib NK, Winter S, Ganchev B, Eccles B, Gerty S, Tfayli A, Lim JS, Yap YS, Ng RC, Wong NS, Dent R, Habbal MZ, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Schroth W, Schwab M, Brauch H. Tamoxifen metabolism predicts drug concentrations and outcome in premenopausal patients with early breast cancer. *Pharmacogenomics J.* 2015 Feb; 15(1): 84-94.
11. Gong IY, Teft WA, Ly J, Chen Y-H, Alicke B, Kim RB, et al. Determination of clinically therapeutic endoxifen concentrations based on efficacy from human MCF7 breast cancer xenografts. *Breast Cancer Res Treat.* 2013 May;139 (1): 61-9.
12. Goetz MP, Sangkuhl K, Guchelaar HJ, Schwab M, Province M, Whirl-Carrillo M, Symmans WF, McLeod HL, Ratain MJ, Zembutsu H, Gaedigk A, van Schaik RH, Ingle JN, Caudle KE, Klein TE. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2D6 and Tamoxifen Therapy. *Clin Pharmacol Ther.* 2018 May;103(5):770-777.

SUMMARY

1. Introduction

Pharmacogenetics, defined as the discipline that studies the variations in the DNA sequence in relation to the response to drugs, has become an area of great importance in the personalized medicine ⁽¹⁾ when prescribing a drug with greater safety and efficacy. In this sense, tamoxifen is a model that should be studied because of its high interindividual variability in the response to treatment and because it is a drug of choice in hormone therapy of breast cancer positive oestrogen receptors (ER+).

According to the Spanish Society of Medical Oncology (SEOM)^a, breast cancer is the most common cancer in women with an incidence of 26,370 new cases per year, a five-year prevalence of 104,405 cases and a mortality of 6,477 women, of whom 76% of primary carcinomas are ER+ and only respond to hormone therapy with tamoxifen between 55-60% ⁽²⁾. This variability in response to treatment at the same dose may be due in part to interindividual genetic differences.

Tamoxifen is a selective modulator prodrug that needs to be metabolized to its primary metabolites N-demethyl-tamoxifen and 4-hydroxy-tamoxifen by several CYP450 enzymes ⁽³⁾. In addition, these two metabolites are metabolized to endoxifen by the enzyme CYP2D6 in 100% and 56%, respectively ⁽³⁾. Endoxifene is the active metabolite responsible for the antiestrogenic effects of tamoxifen. Therefore, an association between the genotype and metabolic phenotype of the CYP2D6 polymorphic gene postulates that pharmacogenetic analyzes will optimize treatment.

^a Sociedad Española de Oncología Médica. Las Cifras del Cáncer en España 2017. www.seom.org

The exercise of Pharmacogenetics in the framework of this model of breast cancer in treatment with tamoxifen, as well as the provision of Law 14/2007^b in the field of Biomedical Research that allows the study of interindividual genetic differences in the response to the drugs and the genetic environmental interactions, makes us intuit that in the short term a pharmacogenetic report will gradually be added to the care activity, as an innovative model to be established in the clinical history of the chronic and polymedicated patient, in order to avoid a risk of sub-optimal treatment and prevent adverse effects.

Pharmacogenetic report that will show medico-legal aspects in the information to the patient, informed consent and the exercise of deliberation, among others, for a proper decision making within the framework of the exercise of personalized and precision medicine.

2. Hypotheses and objectives

The biopathological study of women suffering from breast cancer, in treatment with tamoxifen, justifies the need to perform pharmacogenetic reports, which are incorporated into the patient's clinical history.

The proposed objectives are: to identify in a female population of the Autonomous Community of Madrid (CAM), the distribution of the CYP2D6 gene polymorphisms that may especially involve a reduced metabolic activity; to study the polymorphisms of the CYP2D6 gene in a group of patients with breast cancer under treatment with tamoxifen, as well as their plasma levels of the drug and its metabolites; to propose a pharmacogenetic analysis strategy for the CYP2D6 gene

^b Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica. Boletín Oficial del Estado núm. 159, miércoles 4 julio 2007, pág. 28826-28848.

and plasma levels of tamoxifen and its metabolites; and finally, to propose a pharmacogenetic report model according to medical and legal criteria.

3. Material and methods

A cross-sectional study was conducted in a reference population of the CAM, which is expected to extrapolate the genetic results of CYP2D6 polymorphisms with low metabolic activity of 423 healthy, Caucasian women, classified into age groups. Likewise, previous informed consent, in a subgroup of 100 pre- and postmenopausal women of the population with breast cancer in hormone therapy, the levels of tamoxifen and its metabolites are studied with respect to each of the CYP2D6 polymorphic genotypes identified in the population of reference.

For this, different instrumental techniques were set up according to the availability of analytical equipment in the laboratory itself. The genetic analysis was carried out with the common procedures in Molecular Biology, such as the extraction, purification and quantification of genomic DNA, as well as the pre-amplification of the CYP2D6 gene without the pseudogenes CYP2D7 and CYP2D8 ⁽⁴⁾ through a long PCR and its verification in gel of agarose. All this, followed by a genetic analysis based on a multiplex system of refractory amplification of mutations (ARMS: Amplification Refractory Mutation System) ⁽⁵⁾, modified by us, allowed the identification in battery of the polymorphisms CYP2D6 * 3, * 4, * 5, * 6, * 9, * 10 and * 41 of low metabolic activity.

Regarding the quantitative analysis of tamoxifen and its metabolites (N-demethyl-tamoxifen, endoxifen, 4-hydroxy-tamoxifen), it was performed by reversed phase liquid chromatography with elution gradient coupled to a triple quadrupole mass spectrometer with ion trap (HPLC-MS / MS), widely accepted as a reference

technique in a clinical laboratory environment ⁽⁶⁾. The results obtained were statistically analyzed using the IBM SPSS® Statistics Version 20 software.

4. Results and Discussion

The subgroup of 423 women in the CAM, called the reference population, has served to study the type of CYP2D6 genetic variants with low metabolic activity and their allelic frequencies in the care population. We considered that the frequency of each allelic variant must be previously known, since we had not found demographic data of healthy women from Madrid in relation to the frequencies of low activity CYP2D6 polymorphisms, and in the literature, there are numerous works ⁽⁶⁻⁸⁾ that have been the subject of controversy.

For this, we developed an analytical PCR-ARMS method to identify the CYP2D6*3, *4, *5 and *6 polymorphisms as MP, as well as the CYP2D6 * 9, * 10 and * 41 polymorphisms as MI. The evidence of the results obtained showed that this test has great analytical validity, although its application in clinical practice may be limited due to its complexity and difficult automation.

We have confirmed the presence of each of the polymorphisms CYP2D6*3, *4, *5, *6, *9, *10 and *41 in the reference population, and calculated their allelic frequencies. A total of 6,768 PCR-ARMS reactions confirmed the great majority in the CYP2D6*1 wild type gene with an allelic frequency of 77.6%, followed by the CYP2D6*4 genotype with 13.7%. The genotypes CYP2D6*9, *41, *10 and *3 presented allelic frequencies of 3.19%, 2.60%, 1.54% and 0.83%, respectively. The genotypes CYP2D6*5 and *6 were minority with allelic frequencies of 0.24%. All of them were within the range of population frequencies accepted by the European Cytochrome

P450 Consortium^c for a European Caucasian population. The percentage sum of the frequencies of the alleles *3, *4, *5, *6, *9, *10 and *41 accounted for 22.35% of the total alleles of the reference population. None of them was age dependent (one factor ANOVA, $p = 0.276$).

In addition, we have confirmed the importance of CYP2D6 polymorphisms in relation to the metabolism of tamoxifen, in a study of a total of 100 clinical cases of patients diagnosed with ER+ breast cancer. The model studied is reflected in the works of Madlensky ⁽⁹⁾ and Saladores ⁽¹⁰⁾. The endoxifene concentration in the wild type CYP2D6*1 genotypes was significantly higher than in the MP and MI genotypes, even in the heterozygotes with a single polymorphic allele (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$). The concentration of endoxyphene decreased from highest to lowest in the following allelic order *41, *10, *5, *9, *6, *4 and *3. In all of them, the concentration was well below the endoxifene value for optimal tumor suppression ⁽¹¹⁾.

No intergroup differences of CYP2D6 polymorphisms were observed in the concentration of tamoxifen ($p = 0.099$), so it is not attributed an interest as an indicator in the response to treatment, but as an indicator of therapeutic compliance ⁽¹⁰⁾.

The metabolic association of the drug with the CYP2D6 genotype and following the recommendations of Goetz ⁽¹²⁾, a pharmacogenetic strategy is proposed for the clinical practice. Moreover, the existence of clinical reasons of indication, biotechnical and evidence of care criteria such as the high number of cases of breast cancer and its chronicity in treatment with tamoxifen for years, among others, in addition to medical-legal aspects collected in Law 14/2007 of Biomedical Research, justifies from a legal ethical and deontological medical point of view, the

^c Pharmacogene Variation Consortium en www.pharmvar.org

incorporation of the pharmacogenetic report in the clinical history of the patient as an innovative model of health care, which by virtue of prediction criteria, it will affect in decision-making and the interconsultation deliberation exercise as set out in the Manual of Ethics and Medical Deontology.

5. Conclusions

In relation to objective 1:

First conclusion

The study of the genetic polymorphisms of cytochrome CYP2D6 in healthy women, as well as in patients with breast cancer, allows to identify the population through these biomarkers. Likewise, we have detected polymorphisms compatible with abnormal metabolism of tamoxifen in the range of population frequencies accepted by the European Cytochrome P450 Consortium.

Second conclusion

The study of CYP2D6 polymorphisms using the PCR ARMS multiplex technique, modified by us, allows its usual use in clinical medicine, being of diagnostic utility.

The studies of CYP2D6 polymorphisms with automated techniques may be more effective, but they need to conduct cost-effectiveness studies and select a profile of polymorphisms, before they can be applied in clinical diagnosis.

In relation to objective 2:

Third conclusion

The study of levels of tamoxifen and metabolites (N-demethyl-tamoxifen, 4-hydroxy-tamoxifen and endoxifen) quantified by high-performance liquid chromatography techniques, modified by us, allows the elaboration of a clinical analytical report that allows to improve the control and follow-up of the patients.

Fourth conclusion

The association between the results of CYP2D6 polymorphisms and the monitoring of the levels of tamoxifen and its metabolites allows for the elaboration of a pharmacogenetic report that would make it possible to detect sub-optimal treatments early, avoid adverse effects and detect alterations in therapeutic follow-up.

In relation to objective 3:

Fifth conclusion

With a legal medical criterion, the pharmacogenetic report that we propose is endorsed in article 9 of the Law 14/2007 of Biomedical Research, and can be considered as a complementary report to the clinical history, according to the established in the article 15 of the Law 41/2002 regulating the autonomy of the patient and rights in terms of information and clinical documentation.

Sixth conclusion

We propose that the pharmacogenetic report be considered as an innovative health benefit within the framework of article 14 of Law 11/2017 on Good Governance and Professionalization of the Management of Health Centers and Organizations of the Madrid Health Service, as well as within the framework of Law 16/2003 on cohesion and quality of care of the National Health System.

In relation to objective 4:

Seventh conclusion

The working model and pharmacogenetic report proposed in patients under treatment with tamoxifen can be transferred to other clinical and therapeutic situations related to the analysis of CYP2D6 polymorphisms with other pharmacological groups, used in therapy and metabolically dependent on this cytochrome.

Eighth conclusion

The pharmacogenetic report allows the development of a model of health care that allows optimizing treatment, avoiding and reducing adverse effects, within the framework of the professional practice of a new personalized and precision medicine that is incorporated into the new concepts of humanization of healthcare.

6. References

1. Hood L. Systems biology and p4 medicine: past, present, and future. *Rambam Maimonides Med J*. 2013 Apr;4(2): e0012.
2. Vera Álvarez, J.J. Factores Pronóstico del Cáncer de Mama. *Boletín Oncológico del Área Sanitaria de Teruel*, 2015; noviembre, nº 13.
3. Desta Z, Ward BA, Soukhova NV, Flockhart DA. Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004 Sep;310(3):1062–75.
4. Kimura S, Umeno M, Skoda RC, Meyer UA, Gonzalez FJ. The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene, and a pseudogene. *Am J Hum Genet*. 1989 Dec; 45(6): 889-904.
5. Roberts, R.L. and Kennedy, M.A. Rapid detection of common cytochrome P450 2D6 alleles in Caucasians. *Clinica Chimica Acta*, 2006, 366: 348-351.
6. Rae JM. CYP2D6 genotype should not be used to determine endocrine therapy in postmenopausal breast cancer patients. *Clin Pharmacol Ther*. 2013 Aug;94(2):183-5.
7. Rae JM, Regan M, Leyland-Jones B, Hayes DF, Dowsett M. CYP2D6 genotype should not be used for deciding about tamoxifen therapy in postmenopausal breast cancer. *J Clin Oncol*. 2013, Jul 20; 31(21): 2753-5.
8. Abraham JE, Maranian MJ, Driver KE, Platte R, Kalmyrzaev B, Baynes C, Luccarini C, Shah M, Ingle S, Greenberg D, Earl HM, Dunning AM, Pharoah PD, Caldas C. CYP2D6 gene variants: association with breast cancer specific survival in a cohort of breast cancer patients from the United Kingdom treated with adjuvant tamoxifen. *Breast Cancer Res*. 2010; 12(4).
9. Madlensky L, Natarajan L, Tchu S, Pu M, Mortimer J, Platt SW, et al. Tamoxifen metabolite concentrations, CYP2D6 genotype, and breast cancer outcomes. *Clin Pharmacol Ther*. 2011 May; 89 (5): 718–25
10. Saladores P, Mürdter T, Eccles D, Chowbay B, Zgheib NK, Winter S, Ganchev B, Eccles B, Gerty S, Tfayli A, Lim JS, Yap YS, Ng RC, Wong NS, Dent R, Habbal MZ, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Schroth W, Schwab M, Brauch H. Tamoxifen metabolism predicts drug concentrations and outcome in premenopausal patients with early breast cancer. *Pharmacogenomics J*. 2015 Feb; 15(1): 84-94.
11. Gong IY, Teft WA, Ly J, Chen Y-H, Alick B, Kim RB, et al. Determination of clinically therapeutic endoxifen concentrations based on efficacy from human MCF7 breast cancer xenografts. *Breast Cancer Res Treat*. 2013 May;139 (1): 61-9.
12. Goetz MP, Sangkuhl K, Guchelaar HJ, Schwab M, Province M, Whirl-Carrillo M, Symmans WF, McLeod HL, Ratain MJ, Zembutsu H, Gaedigk A, van Schaik RH, Ingle JN, Caudle KE, Klein TE. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2D6 and Tamoxifen Therapy. *Clin Pharmacol Ther*. 2018 May;103(5):770-77

1. INTRODUCCIÓN

La Farmacogenética^{g,h}, definida como la disciplina que estudia las variaciones en la secuencia de ADN en relación con la respuesta a los fármacos, se ha convertido en un área de gran importancia en la práctica clínica, con peculiar énfasis en aquellas especialidades médicas que necesitan conocer la variabilidad interindividual existente en la respuesta a un mismo fármaco, especialmente en el paciente crónico.

Hasta no hace muchos años, la variabilidad interindividual se atribuía a la propia variabilidad biológica relacionada con la absorción, distribución, metabolización y excreción, y era la Farmacología la disciplina encargada de su explicación; sin embargo, no siempre se justificaba por qué un medicamento tenía capacidad curativa a dosis terapéuticas al mismo tiempo que, en otro paciente con la misma enfermedad, podía conducir a un tratamiento sub-óptimo, reacciones adversas e incluso la muerte.

Las variaciones genéticas son la explicación a la diversidad en la respuesta a los fármacos y, la Farmacogenética en un principio y, la Farmacogenómica^{a,b} después, son las disciplinas responsables de su estudio.

Las nuevas tecnologías aplicadas al análisis genético, así como la finalización del Proyecto del Genoma Humano, junto con la

^g EMEA: European Medicines Agency. EMEA/CHMP/ICH/437986/2006. International Conference on harmonisation (ICH). Topic E15. Definitions for genomic biomarkers, pharmacogenomics, pharmacogenetics, genomic data and sample coding categories. November 2007. <http://www.emea.europa.eu>.

^h Guidance for Industry. E15 Definitions for Genomic Biomarkers, Pharmacogenomics, Pharmacogenetics, Genomic Data and Sample Coding Categories. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Biologics and Research (CBER). April 2008. International Conference on Harmonisation (ICH).

identificación de un gran número de polimorfismos genéticosⁱ, han sido fundamentales para el conocimiento de la variabilidad genética humana, en nuestro caso vinculada al gran desarrollo de la Farmacogenética. Uno de los mejores ejemplos pasea sobre el desarrollo de la medicina personalizada ⁽¹⁾ a la hora de prescribir fármacos seguros y más eficaces. También con relevantes aplicaciones cuando la etiología médico legal de la muerte exige resolver cuestiones científico-periciales sobre una praxis correcta, la responsabilidad médica ⁽²⁾, vinculada a los efectos adversos de fármacos especialmente en oncología médica ^j.

En la última década ^(83, 104, 134, 172, 217-222), se han publicado múltiples observaciones y trabajos atribuyendo a variaciones genéticas como responsables de la variabilidad interindividual en respuesta a la

ⁱ Se define polimorfismo genético, en un sentido amplio, a la variabilidad genética debida a variaciones en la secuencia nucleotídica del genoma. A raíz del Proyecto del Genoma Humano, se clasifican en polimorfismos de un solo nucleótido y polimorfismos estructurales. El primer grupo refiere a aquellas diferencias interindividuales existentes en la posición de un nucleótido en un mismo locus. Los polimorfismos estructurales refieren a inserciones, deleciones, translocaciones, inversiones y duplicaciones que afectan a regiones de ADN de mayor longitud.

Su análisis genético se fundamenta en dos cualidades propias del modelo de doble hélice propuesto por Watson y Crick ⁽⁷⁾ en 1953. Nos referimos al principio de complementariedad y a la capacidad de desnaturalización-renaturalización de la doble hebra de ADN.

El ADN es un polímero formado por una secuencia de nucleótidos, que consisten en la unión de una base nitrogenada, una desoxirribosa y un fosfato. Las bases nitrogenadas se diferencian en las purinas adenina (A) y guanina (G), y las pirimidinas timina (T) y citosina (C). Estos nucleótidos quedan ligados en la longitud de una hebra mediante enlaces fosfodiéster, en la que las bases nitrogenadas A, G, T y C quedan estereoquímicamente expuestas de tal manera que, a su vez, se emparejan mediante puentes de hidrógeno con las bases complementarias de la otra hebra de ADN. Esta unión se produce entre la A-T y G-C. Por ello, la secuencia nucleotídica de una hebra de ADN determina siempre la de su hebra complementaria. Su capacidad de desnaturalización se debe a la rotura de los enlaces de hidrógeno tras una exposición breve a una temperatura determinada, que al desaparecer produce su renaturalización en doble hebra.

^j Forensic Medicine-From Old Problems to New Challenges. Edited by Prof. Duarte Nuno Vieira. ISBN 978-953-307-262-3. Published September 12th, 2011. Chapter 12. Forensic Pharmacogenics by Susi Pelotti and Carla Bini; pages 267- 292.

hormonoterapia con tamoxifeno en cáncer de mama con receptores estrogénicos positivos. No obstante, los mecanismos responsables de estas diferencias interindividuales no están todavía aclarados, haciendo que la asociación entre tamoxifeno y genotipo CYP2D6 sea cuestionada desde un punto de vista clínico (100, 103, 104).

La Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM)^k facilitó en 2017, una visión descriptiva actualizada de lo que representa esta enfermedad en España. El cáncer de mama tuvo la mayor incidencia de entre todos los cánceres en mujeres, con un total de 26.370 casos nuevos diagnosticados, una prevalencia a cinco años de 104.405 casos y una mortalidad de 6477 mujeres, representando el 31%, 18% y el 15% del total de cánceres en mujeres, respectivamente. Ello permite constatar que en España es el cáncer más frecuente en mujeres, y en el mundo, la primera causa de muerte por cáncer en regiones desarrolladas (15,4% del total)^l.

Aproximadamente, el 76% de los carcinomas primarios de mama son receptores estrogénicos positivos (3), y de éstos, sólo responden a la terapia hormonal entre un 55-60% (4).

Una exhaustiva revisión bibliográfica evidencia que desde la primera interacción relevante entre la Farmacogenética y el tamoxifeno hasta la actualidad, se han abierto nuevos interrogantes farmacogenéticos sobre la hormonoterapia con tamoxifeno en el marco del ejercicio de

^k Sociedad Española de Oncología Médica. Las Cifras del Cáncer en España 2017. www.seom.org

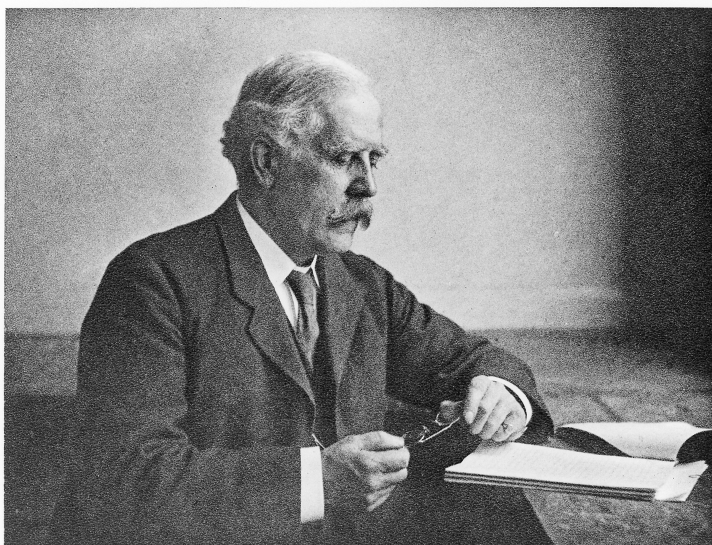
^l International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. <http://globocan.iarc.fr>

una medicina personalizada y de precisión, y por lo tanto sugiere con paulatina y progresiva evidencia la necesidad del informe farmacogenético como una nueva aportación a la paciente en el tratamiento prolongado con tamoxifeno; por extensión de este modelo, su incorporación en la historia clínica del paciente crónico y polimedicado conllevaría una mejor calidad asistencial, así como una prevención de posibles riesgos médico-legales, éticos y deontológicos.

1.1 ORIGEN DE LA FARMACOGENÉTICA

No será hasta principios del siglo XX cuando se asocia por primera vez la predisposición hereditaria de ciertos individuos con un trastorno metabólico. El médico clínico británico Archibald Edward Garrod, conocedor del trabajo de Gregor Mendel de 1866 sobre las leyes de la herencia, vino a sugerir que existía una predisposición hereditaria a la enfermedad ⁽⁵⁾. Desarrolló el concepto de individualidad química en el hombre, haciendo hincapié en la naturaleza congénita y metabólica de la alcaptonuria ⁽⁶⁾, así como de otros desórdenes a los que nombró inicialmente con el término de errores innatos del metabolismo^m, y culminó con la publicación del libro "The inborn factors of disease" en 1931.

Figura 1. Retrato de Archibald Edward Garrod, por Frederick Gowland Hopkins. Publicada en Obituary notices of Fellows of the Royal Society, 1936-1938, volumen 2, page 225. Imagen obtenida de la colección General Collections de la Wellcome Library de Londres.

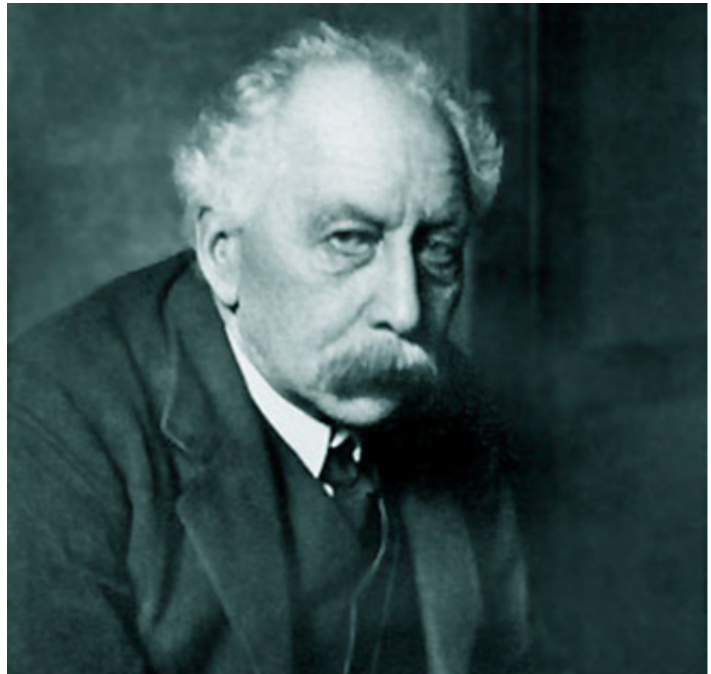


A.E. Garrod.

^m Inborn Errors of Metabolism. The Croonian Lectures delivered before the Royal College of Physicians of London, in June 1908 by Archibald E, Garrod.

William Bateson, profesor de biología en la Universidad de Cambridge, fue quien corroboró que la alcaptonuria se detectaba con mayor frecuencia en los hijos de individuos emparentados como primos hermanos, y que interpretó como una herencia recesiva. El redescubrimiento de las leyes de Mendelⁿ en 1902, arrojaron luz sobre algo que había estado tanto tiempo en el olvido, convirtiéndose en un modelo para la nueva ciencia de la genética.

Figura 2. Retrato de William Bateson. Profesor de biología en la Universidad de Cambridge (1908-1910) y director de la John Innes Horticultural Institution (1910-1926). Imagen obtenida de Biografías y Vidas, la Enciclopedia Biográfica en Línea.

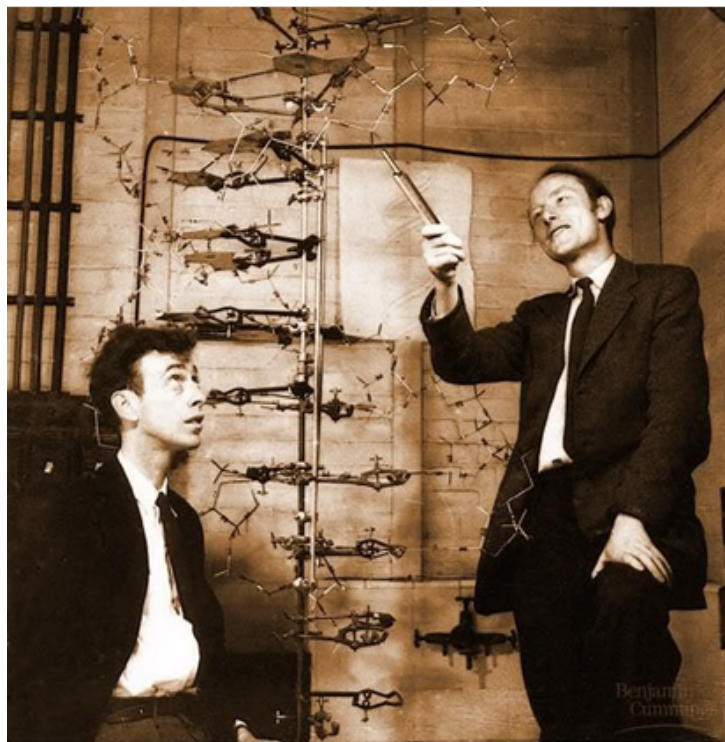


La década de los cincuenta, marcó sin duda alguna un antes y un después. El descubrimiento de la estructura del ADN por James Dewey Watson y Francis Crick ⁽⁷⁾, y la asociación de las variaciones genéticas enzimáticas con una reacción adversa en los casos de fármacos como Primaquina, Suxametonio e Isoniazida, dieron lugar a la gestación de

ⁿ Bateson, W. Mendel's principles of heredity: A defence. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK, 1902.

un modelo que orientó sobre la necesidad de analizar los rasgos farmacogenéticos y, en consecuencia, a la acuñación del nombre de Farmacogenética al final de la década.

Figura 3. Retrato de James D. Watson (izquierda) y Francis Crick (derecha). Publican la estructura de la doble hélice de ADN en abril de 1953 en la revista *Nature*. Reciben el premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1962. Imagen modificada por Benjamin Cummings y obtenida de la página web big.com/images.



La Primaquina resultó ser el fármaco más eficaz y ampliamente testado para la cura de la malaria producida por el *Plasmodium vivax*; sin embargo, en 1952 se publicó que la Primaquina, así como cualquier otro fármaco antimalárico químicamente relacionado, desarrollaba crisis hemolíticas agudas en aproximadamente el 10% de los soldados afro-estadounidenses, y sólo en un número reducido de soldados caucásicos ⁽⁸⁾. Su causa era una deficiencia de la enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PD) ⁽⁹⁾. Hoy en día sabemos, que la metabolización de la Primaquina por la enzima CYP2D6 produce la liberación de sustancias tóxicas oxidativas como el H_2O_2 , y en consecuencia un efecto hemotóxico en ausencia de G6PD ⁽¹⁰⁾.

El segundo ejemplo de variación genética surge en 1953, tras introducir la Isoniazida como fármaco eficaz en el tratamiento de la tuberculosis; sin embargo, Hughes describiría diferencias interindividuales en la eliminación de la Isoniazida debido a una falta de acetilación en acetilisoniazida ⁽¹¹⁾. Los acetiladores lentos eran más propensos a sufrir neuritis periférica por la toxicidad de la isoniazida en el sistema nervioso periférico ⁽¹²⁾. No obstante, las bases genéticas moleculares no serían dilucidadas hasta 1991, cuando se demostró ser debido a mutaciones en el gen de la enzima N-acetiltransferasa-2 (NAT2) del cromosoma 8 ^(13, 14).

El tercer ejemplo de variación genética se publicó en 1956 con la succinilcolina, también conocido como Suxametonio; fármaco que causaba parálisis musculares, por lo general de unos pocos minutos, pero en algunos individuos se podía prolongar hasta por una hora, conduciendo a una apnea más prolongada ⁽¹⁷⁾. Este efecto se debía a una alteración de la cinética de la enzima pseudo-colinesterasa (butirilcolinesterasa). Estudios familiares evidenciaron una deficiencia de la pseudo-colinesterasa, heredada como un rasgo autosómico recesivo ⁽¹⁵⁾.

En 1957 Arno Motulsky marcaría el verdadero comienzo de la Farmacogenética como una disciplina diferenciada. Su publicación mostró cómo genes heredados, controladores de factores enzimáticos, explicaban por qué algunas personas para una exposición idéntica enfermaban, mientras que otras no se veían afectadas ⁽¹⁷⁾. No obstante, no sería hasta 1959 cuando Friedrich Vogel acuñase el

nombre de Farmacogenética como tal, en Heidelberg (Alemania) ⁽¹⁸⁾; y sería en 1969 cuando en un estudio con gemelos idénticos, realizado por Alexanderson ⁽¹⁹⁾ y posteriormente por Vesell ⁽²⁰⁾, surgiera la primera evidencia de que los factores genéticos eran la base de la mayor parte de la variabilidad interindividual metabólica.

Figura 4. Retrato de Friedric Vogel (1925-2006). Médico genetista, nacido y educado en Berlín. Cofundador de la revista Human Genetics, y autor de la palabra Farmacogenética. Imagen obtenida de la transcripción editada de la entrevista realizada por Peter Harper en diciembre de 2003 en la editorial Springer Verlag. Genetics and Medicine Historical Network, Recorded Interviews of Vogel.
<https://genmedhist.eshg.org>



1.2 ORIGEN DEL TAMOXIFENO.

Se atribuye en 1965 el descubrimiento del tamoxifeno y su aplicación posterior como agente antineoplásico al Dr. Arthur L. Wapole, endocrinólogo especialista en reproducción, en aquel entonces jefe y director de equipo del programa de control de fertilidad en los laboratorios Imperial Chemical Industries (ICI) de Alderley Park, Macclesfield, Cheshire (Londres). El tamoxifeno fue patentado como una molécula útil para el control de tumores con dependencia hormonal, así como para el control del ciclo hormonal y aberraciones del mismo°. En aquel entonces, se nombró como ICI N° 46.474. Este isómero trans presentaba una especificidad inusual entre

° Harper, M.J.K, Richardson D.N. and Walpole, A.L. UK Patent Specification n° 1,013,907. (1965)

especies. Actuaba en ratas como un potente antiestrogénico a dosis mínimas inhibiendo la ovulación; sin embargo, en ratones era un potente estrogénico ⁽²¹⁾. Esta farmacodinamia tan diferente, motivó el inicio de varios ensayos clínicos en dos líneas, una en la regulación del ciclo hormonal reproductor y otra en el control de tumores hormono dependientes.

En referencia a la regulación del ciclo hormonal, se demostró que no actuaba como un contraceptivo en mujeres, sino que inducía la ovulación como otra hormona más, a diferencia de su efecto en ratas donde evitaba la implantación del ovocito ^(22, 23). Era un fármaco pro-fertilidad. Ello motivó su abandono como primera terapia anticonceptiva.

Respecto al control de tumores hormono dependientes, cabría resaltar los descubrimientos de Korenman y Dukes ⁽²⁴⁾ en 1970. La vinculación de la existencia de la hormona estrogénica 17-beta-estradiol con la presencia de receptores de estrógeno en tumores de mama de mujeres postmenopáusicas, fundamentó el papel de los estrógenos en el crecimiento del cáncer de mama. La posibilidad de que el ICI 46.474 inhibiera a bajas dosis la actividad del estrógeno, no podía ser excluido como evidencia ante tales descubrimientos. Por ello, se iniciaron en el "Christie Hospital" y "Princess Margaret Hospital", sitios en las ciudades de Manchester y Birmingham, respectivamente, ensayos clínicos de cáncer de mama hormonodependiente, recurrente o terminal y con más de cinco años de estado menopáusico.

En 1973, Ward ⁽²⁶⁾ concluyó que una dosis de 20mg dos veces al día producía, en un 77% de las pacientes con cáncer de mama avanzado, una paralización o retroceso del crecimiento tumoral, y confirmó que las pacientes no mostraron un efecto virilizante ni retención de líquidos. El ICI 46.474 presentaba una actividad

equivalente a tratamientos con altas dosis de andrógenos, pero con una baja incidencia de efectos secundarios.

Como resultado de ello, Nolvadex, la marca ICI de tamoxifeno, fue aprobada en 1973 por el "Committee on the Safety of Medicines" en Reino Unido para el tratamiento de cáncer de mama. La historia del tamoxifeno habría finalizado de no haber sido reinventada como primera terapia para el cáncer de mama ⁽²⁷⁾.

Desde este momento, este fármaco fue ampliamente aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) para todos los estados de cáncer de mama receptores estrogénicos positivos (ver tabla 1), incluso para la prevención en mujeres con un alto riesgo de desarrollar la enfermedad ⁽²⁸⁾. En la actualidad, se sabe que el tamoxifeno es un profármaco modulador selectivo, antiestrogénico en células de cáncer de mama y estrogénico en otros tejidos. que requiere una bioactivación

Cualidad entre otras que ha motivado su elección como hormonoterapia contra el cáncer de mama en más de 110 países cuando la biopsia indica la presencia de receptores estrogénicos positivos, utilizándose en dosis bajas estándar de 20mg/día durante un mínimo de 5-10 años, tanto en pacientes premenopáusicas como postmenopáusicas. Así pues, podemos decir que es un fármaco de elección y se conoce ampliamente su eficacia como sus ineficacias ^P.

^P Furr BJ, Jordan VC. The pharmacology and clinical uses of tamoxifen. *Pharmacol Ther.* 1984; 25(2): 127–205.

Styles JA, Davies A, Lim CK, De Matteis F, Stanley LA, White IN, et al. Genotoxicity of tamoxifen, tamoxifen epoxide and toremifene in human lymphoblastoid cells containing human cytochrome P450s. *Carcinogenesis.* 1994 Jan;15(1):5–9.

Moorthy B, Sriram P, Pathak DN, Bodell WJ, Randerath K. Tamoxifen metabolic activation: comparison of DNA adducts formed by microsomal and chemical activation of tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen with DNA adducts formed in vivo. *Cancer Res.* 1996 Jan 1;56(1):53-7.

Pongracz K, Pathak DN, Nakamura T, Burlingame AL, Bodell WJ. Activation of the tamoxifen derivative metabolite E to form DNA adducts: comparison with the adducts formed by microsomal activation of tamoxifen. *Cancer Res.* 1995, Jul 15;55(14):3012–5.

Tabla 1. Evolución histórica de los ensayos clínicos más significativos que dieron lugar, en sus diferentes fases, a la autorización del tamoxifeno como fármaco contra el cáncer de mama por la FDA (Food and Drug Administration).

Se aprueba el tamoxifeno en EE. UU sólo para cáncer de mama RE (+) en estado avanzado de mujeres postmenopáusicas.	1977	
	1978	Emerge el significado clínico de los análisis histopatológicos en cáncer de mama. Pacientes RE (+) y RPG (+) responden mejor con tamoxifeno ⁽¹³⁷⁾ .
Se inician trabajos en pacientes premenopáusicas RE (+), ganglios negativos y en estado avanzado de cáncer de mama ^(138,139) .	1979	
	1981	Se demuestra mayor eficacia en pacientes postmenopáusicas RE (+) que en premenopáusicas ⁽¹⁴⁰⁻¹⁴²⁾ . Inhibe completamente la aparición de tumores mamarios ⁽¹⁴³⁾ .
Nolvadex® llegó a ser la hormonoterapia de elección en más de 110 países ⁽¹⁴⁴⁾ .	1984	
	1985	Se concluye mayor supervivencia con terapia adyuvante quimio-endocrina ^(34,35,144-148) .
FDA aprueba uso tamoxifeno como adyuvante con quimioterapia.	1986	
	1987	Se concluye ensayo clínico con 1312 pacientes postmenopáusicas nódulos axilares negativos y positivos ⁽¹⁴⁹⁾ .
FDA aprueba uso tamoxifeno como adyuvante en pacientes postmenopáusicas ganglios positivos.	1988	
	1989	Múltiples ensayos concluyen: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Tamoxifeno controla el crecimiento cáncer de mama en pacientes premenopáusicas ^(136,149-155). ▪ Mayor supervivencia en premenopáusicas RE (+) ganglios negativos ⁽¹⁵⁶⁾. ▪ Terapia 5 años evita recidivas ⁽¹⁵⁷⁾. ▪ Quimioterapia y tamoxifeno durante 5 años no mejora eficacia ⁽¹⁵⁸⁾. ▪ Terapia adyuvante a 1 año es ineficaz en premenopáusicas RE (+) y, RE (-) no mejoran a 5 años ⁽¹⁵⁹⁾. ▪ Se publica una evaluación de la toxicidad aguda durante la prevención de cáncer de mama con más de 2000 mujeres de alto riesgo ⁽¹⁶⁰⁾.
FDA aprobó su uso en pacientes pre y postmenopáusicas con ganglios negativos y RE (+).	1990	

Tabla 1(continuación).

	1992	Se inicia evaluación ensayo clínico randomizado con tamoxifeno como preventivo. Tamaño muestral de 13.800 mujeres de alto riesgo pre y postmenopáusicas. Reducción del 50% en recaídas con respecto a pacientes con placebo. Mujeres postmenopáusicas presentaron un aumento de coágulos de sangre y cáncer de endometrio ⁽²⁸⁾ .
FDA aprueba uso para la reducción del riesgo de cáncer de mama en mujeres pre y postmenopáusicas.	1998	
	2001	Tratamiento 10 años incrementa n° recidivas, cáncer de endometrio y coágulos en sangre ⁽¹⁶¹⁾ . Cinco años de tratamiento fue la estrategia de elección.
Múltiples ensayos concluyen: <ul style="list-style-type: none"> ▪Terapia 5 años disminuye tasa de mortalidad ⁽¹⁵⁹⁾ y mejora supervivencia ⁽¹⁶²⁾ en RE (+). ▪Hormoterapia idónea como quimioprevención ⁽¹⁶³⁾. ▪Inhibidores aromatasa (IA) a largo plazo permiten controlar la enfermedad con unos efectos secundarios reducidos ^(164, 165). ▪IA mejoran pronóstico ⁽¹⁶⁶⁾, incluso después de un par de años con tamoxifeno ⁽¹⁶⁷⁾ o incluso 5 años ⁽¹⁶⁸⁾. Sólo pueden utilizarse inhibiendo la función ovárica. ▪Los IA reducen la síntesis de estrógenos en todos los tejidos. Ello implica más fracturas óseas ⁽¹⁶⁹⁾ y una mayor pérdida de masa ósea ⁽¹⁷⁰⁾, requiriendo una evaluación periódica para evitar osteoporosis prematura. ▪Tamoxifeno mantiene o mejora la densidad ósea en este grupo ⁽¹⁴⁸⁾. 	2003	
	2005	La EBCTCG (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group) confirma que la terapia adyuvante de 5 años alarga la vida al menos durante una década después de suspender el tamoxifeno ⁽¹⁷¹⁾ .
Actualmente, tamoxifeno continúa siendo el fármaco de elección durante el período premenopáusico. Población en la que no aumenta la incidencia de coágulos de sangre o cáncer de endometrio ⁽²⁸⁾ .	↓ 2017	

1.3 FARMACOGENÉTICA Y TAMOXIFENO.

La década de 1970 marcó importantes avances tanto en el conocimiento farmacocinético y farmacodinámico del tamoxifeno como en la Farmacogenética; sin embargo, no se llegó a consolidar un punto de unión con evidencia suficiente.

Estudios de laboratorio con animales demostraron que el tamoxifeno bloqueaba la unión del estrógeno a los receptores estrogénicos; debía ser utilizado como terapia adyuvante de larga duración para suprimir la recurrencia de tumores y tenía un potencial químico preventivo ⁽²⁹⁻³⁶⁾. Paralelamente, la Farmacogenética seguía avanzando tras el descubrimiento del polimorfismo de oxidación de la debrisoquina ⁽¹⁰⁵⁾ y la esparteína ⁽¹⁰⁶⁾, dos fármacos utilizados como antihipertensivo y antiarrítmico, respectivamente. Ambos fármacos eran metabolizados por la misma enzima, una monoxigenasa del citocromo P450 (CYP450) que más tarde se denominó enzima CYP2D6 ⁽¹⁰⁷⁾. Su deficiencia justificaba un elevado nivel de ambos fármacos y los consecuentes efectos adversos en el paciente ^(108,109).

Un salto cualitativo y cuantitativo en la proyección de la Farmacogenética aconteció en la década de los ochenta. Se puso en marcha el mayor proyecto biomédico de la historia con el objetivo de conseguir la secuencia completa del genoma humano. El Consorcio Internacional de Secuenciación del Genoma Humano (IHGSC: International Human Genome Sequencing Consortium) fue quien llevó a término tal investigación.

Además, en esta década, Distlerath y col. ⁽¹¹⁰⁾ purificaron la enzima monoxigenasa del citocromo

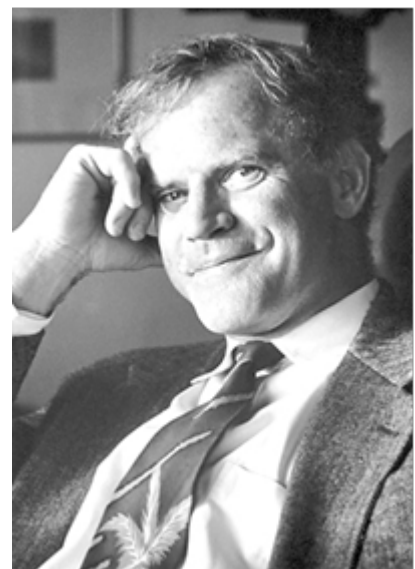


Figura 5. Kary Mullis. Bioquímico estadounidense. Premio Nobel de Química en 1993. Desarrolló el método de amplificación de ADN por PCR. Imagen obtenida de la web big.com/images.

P450 a partir de hígado humano; Kary Mullis ⁽¹¹¹⁾ descubrió el método para la amplificación sintética de ADN, conocido como PCR (Polymerase Chain Reaction); Frank González y col. ⁽¹⁰⁷⁾ clonaron la monooxigenasa del citocromo P450 a partir del cDNA, nombrándola por primera vez como enzima CYP2D6; y en 1989 Kimura y col. ⁽³⁷⁾ secuenciaron el gen nativo CYP2D6*1. Un año después, se publicó la secuencia nucleotídica de los dos alelos más importantes con baja actividad metabólica, CYP2D6*4 y CYP2D6*3 ^(112, 113). Evidencias que motivaron numerosos estudios relacionando el genotipo con la enfermedad, así como con la variabilidad inter-grupos poblacionales.

A finales del siglo XX, destaca el acuerdo del consorcio SNip (SNP Consortium) para mapear en humanos los polimorfismos genéticos de un solo nucleótido (SNP: Single Nucleotide Polymorphism), y así poder personalizar los medicamentos y reducir los efectos adversos de los fármacos existentes ⁽¹¹⁴⁾. En abril de 2003, el IHGSC anuncia la finalización esencial de la secuencia del genoma humano. Ésta tenía 3x10⁹ nucleótidos y más de 10 millones de SNP ⁽¹¹⁵⁾.

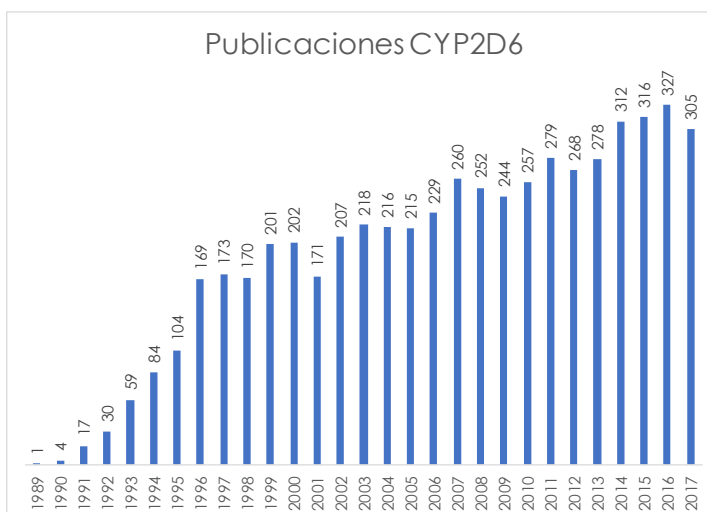
Sin duda alguna, los avances tecnológicos y la finalización del Proyecto Genoma Humano proporcionaron la base genética para que la Farmacogenética avanzara como disciplina; pero no sería hasta 2004 cuando se produjera una evidente interacción entre la Farmacogenética y el tamoxifeno.

Desta y col. ⁽¹¹⁶⁾ publican, por primera vez, la biotransformación metabólica secuencial del tamoxifeno e identifican la enzima CYP2D6 como una de las más activas en la formación de aquellos metabolitos hidroxilados del tamoxifeno identificados con actividad antiestrogénica. Variantes genéticas CYP2D6 con baja actividad metabólica, podrían augurar una menor concentración de metabolitos bioactivos y en consecuencia un menor éxito en el tratamiento de cáncer de

mama. Podemos decir que la enzima CYP2D6 tiene un gran interés, a pesar de que sólo representa el 4% de las enzimas hepáticas ⁽¹¹⁸⁾. Cataliza el 25% de todas las reacciones de biotransformación de los fármacos más comunes ⁽¹¹⁷⁾, por lo que su variabilidad interindividual ha sido uno de los aspectos más estudiado por la Farmacogenética, tal y como se refleja en la figura 6 con más de 5.267 publicaciones editadas desde la secuenciación por Kimura y col. ⁽³⁷⁾ en 1989.

Actualmente, este abundante trabajo de investigación se recoge de forma seleccionada por el comité internacional de nomenclatura CYP (CYP allele nomenclature committée) en su página web oficial^a, en la que se lista una amplia clasificación alélica CYP2D6 con sus variantes y fenotipos metabólicos asociados.

Figura 6. Publicaciones por año cerrado, desde 1989 hasta 2017, editadas en revistas científicas y seleccionadas por la palabra clave CYP2D6 en el título del resumen (abstract). La suma de todas ellas asciende a un total de 5.568 y la primera de ellas, refiere a la secuenciación del gen nativo CYP2D6*1 por Kimura y col. ⁽³⁷⁾ en 1989. Los datos fueron obtenidos de la base de datos PubMed de la US National Library of Medicine and National Institutes of Health.



Sin duda alguna, la consolidación durante este tiempo de la Farmacogenética como disciplina y las aportaciones de Desta y colaboradores ⁽¹¹⁶⁾, permitieron vincular el gen CYP2D6 con la bioactivación del tamoxiemo, tal y como se recoge en el cronograma de la figura 7, abriéndose nuevos interrogantes sobre la variabilidad interindividual en la respuesta a la hormonoterapia con tamoxifeno en cáncer de mama.

^aActualmente, las bases de datos de la página web oficial www.cypalleles.ki.se han sido movidas a la web de Pharmacogene Variation Consortium www.pharmvar.org, donde se dispone de la clasificación de las familias CYP450 y sus variantes genéticas.

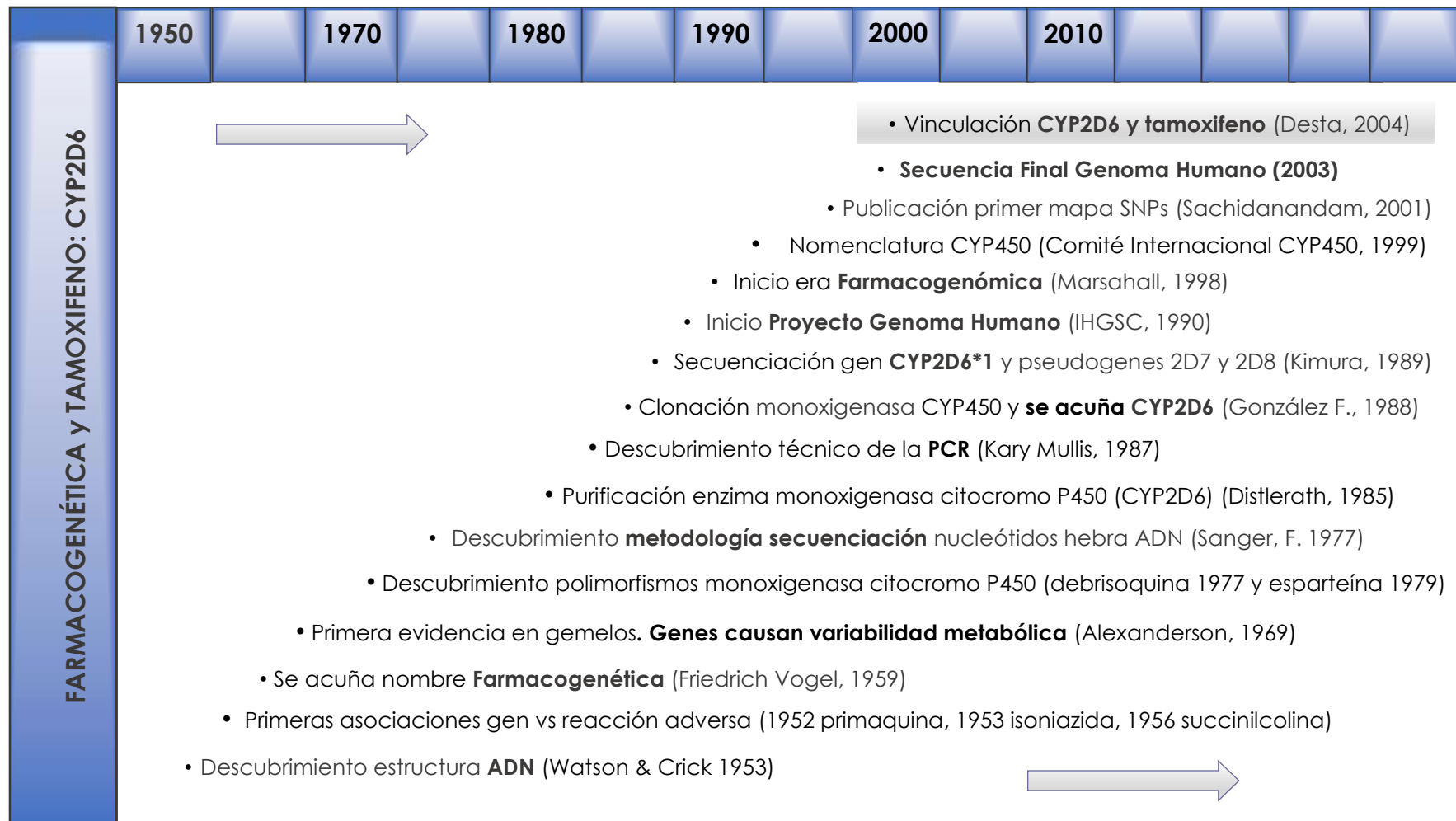


Figura 7. Cronograma en décadas hasta 2004 de los descubrimientos científicos más significativos, que permitieron una consolidación de la Farmacogenética como disciplina y su conexión con el gen CYP2D6 como principal responsable de la variabilidad interindividual en la respuesta al tratamiento con tamoxifeno en cáncer de mama.

1.4 METABOLISMO DEL TAMOXIFENO.

El tamoxifeno es un profármaco modulador selectivo que requiere de una biotransformación metabólica para ejercer su efecto antiestrogénico. Ello es posible gracias a una serie de enzimas CYP450 del tipo CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5, CYP2C9, CYP2C19, CYP2B6 y CYP1A2, que participan en la Fase I del metabolismo enterohepático del tamoxifeno ^(116, 119, 120, 121). Metabolización ampliamente estudiada por Desta y colaboradores ⁽⁹²⁾ en 2004, la cual se detalla en la figura 8.

Dos son las posibles vías de formación del endoxifeno, principal metabolito bioactivo antiestrogénico del tamoxifeno en tejido de mama. Una de ellas, realiza una desmetilación del grupo amino del tamoxifeno para dar lugar al N-desmetil-tamoxifeno (N-D-TAM). Esta ruta cataliza el 90% del tamoxifeno como tal, con una $V_{\max} = 62 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína, por lo que se ha identificado como la vía principal ⁽¹¹⁶⁾. Según estudios de inhibición con ketoconazol y troleandomicina, indican que la enzima CYP3A4 cataliza mayoritariamente esta desmetilación, ya que inhiben el 90% de la formación de N-D-TAM. Otras enzimas como CYP2C9, CYP1A2, CYP2C19 y CYP2D6 tienen una participación poco significativa; su inhibición no afecta en la concentración de N-D-TAM.

La segunda vía cataliza la hidroxilación del tamoxifeno dando lugar al 4-hidroxi-tamoxifeno (4-OH-TAM). Esta es una vía minoritaria, con una $V_{\max} = 1.92 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína. Inhibidores específicos, como la quinidina, indicaron que la enzima CYP2D6 cataliza en más de un 56% la formación de 4-OH-TAM. Metabolito cuya afinidad por los receptores estrogénicos es superior a la del endoxifeno, aunque no su concentración ⁽¹²⁷⁾. Otras enzimas como CYP2C19, CYP2C9, CYP2B6 y CYP3A4/5 participan en porcentajes minoritarios.

Tanto el N-D-TAM como el 4-OH-TAM se conocen como metabolitos primarios del tamoxifeno y, cualquiera de las dos moléculas, tiene capacidad de formar

endoxifeno. Molécula a la que se atribuye una elevada bioactividad antiestrogénica por su elevada afinidad por los receptores estrogénicos de las células tumorales de tejido de mama. Su biotransformación se cataliza exclusivamente por la enzima CYP2D6 a partir del N-D-TAM y, por las enzimas CYP3A4/A5, a partir del 4-OH-TAM.

Las concentraciones de estos dos metabolitos primarios se estabilizan en la fase estacionaria, momento en el que la concentración de N-D-TAM casi duplica a la del tamoxifeno, y de endoxifeno supera al 4-OH-TAM ^(122-124, 63). Motivo por el que se recomienda analizar los niveles de tamoxifeno, N-D-TAM y 4-OH-TAM una vez alcanzada la fase estacionaria.

En el caso del tamoxifeno, esta fase estacionaria se alcanza al mes del inicio del tratamiento y tiene una vida media de eliminación de 5-7 días; y con respecto a los metabolitos primarios N-D-TAM y 4-OH-TAM alcanzan la fase estacionaria en 3-4 meses, con unas vidas medias de eliminación de 14 días y 7 días, respectivamente ^(122, 124). Ello significa que los niveles de endoxifeno deberán realizarse como mínimo a partir de los 4 meses.

Finalmente, el endoxifeno, así como el tamoxifeno y el resto de sus metabolitos, son inactivados mediante reacciones de glucuronización y sulfatación (Figura 3), eliminándose principalmente por vía urinaria y biliar. Los primeros indicios metabólicos de interés a este respecto comenzaron en 1973 cuando Fromson y colaboradores ^(125, 126) describieron las rutas de excreción en animales y mujeres. Sugirieron que la mayor ruta de aclaramiento ocurría por vía biliar; sin embargo, fue posteriormente cuestionada, sólo habían analizado heces y existía un metabolismo intestinal y reabsorción de metabolitos no considerado en su estudio. Sería Lien ⁽⁸⁹⁾ en 1988 cuando analizó directamente el drenaje biliar, demostrando una circulación enterohepática del endoxifeno. Este metabolito era fundamental en el

mecanismo de acción antiestrogénico del tamoxifeno en cáncer de mama, como se ha visto en la actualidad. La presencia del endoxifeno fue demostrada en tejido de mama ⁽¹²⁸⁾, y se considera como el metabolito del tamoxifeno más bioactivo en el tratamiento y prevención de cáncer de mama receptores estrogénicos positivos. Presenta mayor concentración e igual afinidad que 4-OH-TAM.

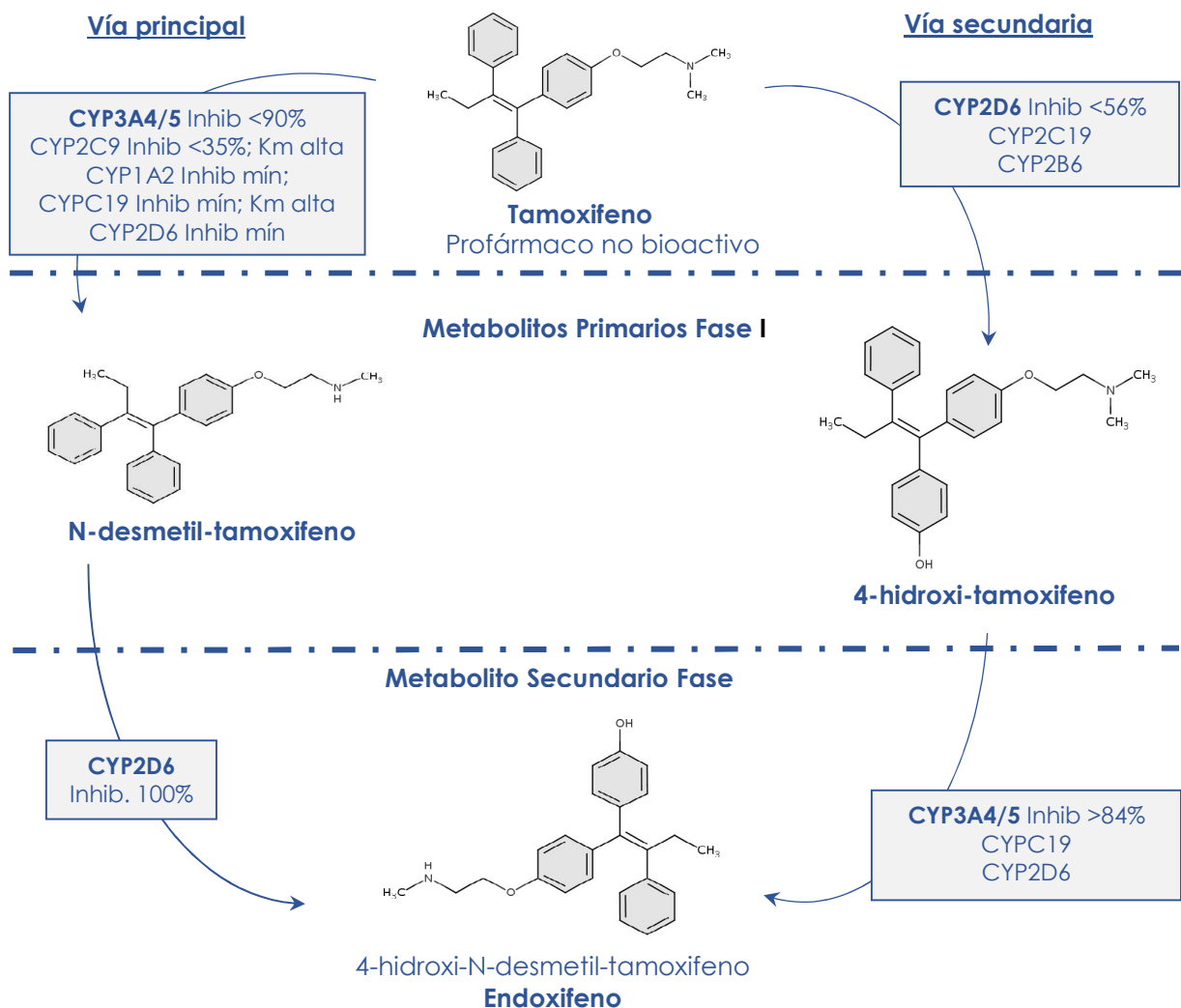


Figura 8: Metabolismo tamoxifeno. Rutas principales según Desta y colaboradores ⁽⁹²⁾. La vía principal metaboliza el 90% del tamoxifeno en N-desmetil-tamoxifeno con una $V_{max} = 62 \text{ pmol/min/mg proteína}$, mediante las enzimas CYP3A4/5 mayoritariamente. La vía secundaria metaboliza el 10% del tamoxifeno en 4-hidroxi-tamoxifeno con una $V_{max} = 1,92 \text{ pmol/min/mg proteína}$, mediante las enzimas CYP2D6, CYP2C19 y CYP2B6, principalmente, aunque la enzima CYP2D6 representa el 56% de la actividad. La concentración del endoxifeno será dependiente mayoritariamente de la actividad enzimática CYP2D6 y CYP3A4/5, ya que actúan significativamente en ambas vías metabólicas.

1.5 POLIMORFISMOS CYP2D6 Y METABOLISMO DEL TAMOXIFENO.

La actividad enzimática CYP2D6 puede variar, en mayor o menor medida, en función de la combinación de alelos del gen CYP2D6 presentes en el ADN genómico, de forma que su análisis genético sugiere poder predecir la respuesta farmacológica ante aquel medicamento que requiera metabolizarse por la misma ruta. En lo que respecta al tamoxifeno, fueron múltiples las publicaciones que referían a su actividad antiestrogénica ⁽³¹⁻³³⁾, no obstante, a principios del siglo XXI poco se sabía sobre su biotransformación metabólica y variabilidad interindividual. A este respecto, Ring y col. ⁽⁹³⁾ en 2004 justificaron la variabilidad interindividual en la respuesta al tratamiento como una bioactivación alterada del tamoxifeno en endoxifeno, bien por factores genéticos bien por factores ambientales. Propuestas que fueron confirmadas posteriormente.

En 2005, Andersson y col. ⁽⁴⁸⁾ hacen una revisión de la distribución de los alelos más comunes del gen CYP2D6 según el grupo poblacional. Un total de 52 alelos CYP2D6 habían sido descritos; sin embargo, no todos ellos presentaban claras diferencias funcionales con respecto al gen nativo CYP2D6*1 secuenciado por Kimura ⁽³⁷⁾ en 1989. Ahora bien, sí estaba confirmado que los alelos CYP2D6*3, *4, *5, *6, *7, *8, *11, *12, *13, *14, *15, *16, *18, *19, *20, *21, *38, *40, *42 y *44 no presentaban actividad metabólica; y en el caso de los alelos CYP2D6*10, *17, *36 y *41, la actividad era reducida.

En referencia al grupo caucásico europeo, grupo en el que se encuadran las muestras objeto de análisis para esta tesis, las variantes CYP2D6 con actividad metabólica incluían el CYP2D6*1 y los alelos *2, *9, *10, *17 y *41, aunque en el caso de los alelos *10 y *41, presentaban una actividad reducida ⁽²⁾. Entre los alelos sin actividad estaban las variantes CYP2D6*3, *4, *5, *6, *7 y *8, siendo el polimorfismo

CYP2D6*4 mayoritario ⁽⁴⁸⁾. Factores intrínsecos como el grupo poblacional y la genética CYP2D6 eran causa de valoración e interpretación clínica por su implicación en la variabilidad individual dosis respuesta. Ello marcó, en la comunidad científica, un interés por conocer la frecuencia alélica de los alelos CYP2D6 en caucásicos, africanos, asiáticos ^(129, 130), y su impacto sobre el metabolismo del tamoxifeno ⁽¹³¹⁾.

El fenotipo metabolizador de los alelos del gen CYP2D6 fue definido como la relación metabólica entre la concentración de un fármaco (molécula madre) y la concentración de su metabolito principal en un momento específico. Surgió así, una clasificación fenotípica del gen CYP2D6 en metabolizador pobre (MP), intermedio (MI), extensivo o normal (ME) y ultrarrápido (MU). Sachse ⁽¹²⁹⁾ en 1997, Bradford ⁽¹³¹⁾ en 2002, Raimundo ⁽²⁾ en 2004, Jin ⁽¹²⁴⁾ en 2005 describieron las frecuencias de las variantes alélicas más comunes del CYP2D6 en una población caucásica. Actualmente, se han identificado más de 100 polimorfismos de nucleótido único (SNP), aunque existen inconsistencias de definición para una precisa adscripción de una variante génica a uno de los fenotipos definidos.

Jin y col. ⁽¹²⁴⁾ en referencia al gen CYP3A5, implicado en ambas vías de biotransformación del tamoxifeno a endoxifeno, aludieron a la existencia de niveles de endoxifeno en pacientes CYP3A5*3 inferiores a las variantes funcionales CYP3A5*1/*1 o CYP3A5*1/*3; sin embargo, no fue estadísticamente demostrado, ni ha sido confirmado posteriormente por otros autores ^(77, 83, 132, 133, 134). A este respecto, resaltar el estudio de Goetz y col. ⁽⁹⁷⁾ por ser el más concluyente clínicamente; utilizaron bloques tumorales RE+ de mujeres postmenopáusicas en terapia adyuvante con tamoxifeno durante cinco años, para determinar los genotipos CYP2D6*4 y *6, así como CYP3A5*3 y *17. La variante CYP3A5*3 no fue asociada con resultados clínicos adversos. No obstante, constataron que cuando la paciente era

portadora del genotipo CYP2D6*4 tenían un riesgo más elevado de recurrencia de cáncer de mama y una incidencia baja de sofocos.

La molécula endoxifeno despertó mayor interés en la comunidad científica entre 2004 y 2006, momento en el que se realizaron estudios de farmacología más consistentes. Johnson y col. ⁽¹³⁵⁾ primero la caracterizaron molecularmente, y Lim y col. ^(136,137) después, concluirían que el endoxifeno y el 4-hidroxi-tamoxifeno tienen el mismo efecto inhibitorio sobre el crecimiento de células MCF-7 de cáncer de mama estimuladas con estrógeno.

Los factores intrínsecos como el grupo poblacional y la variabilidad en la secuencia del gen, como causa de variabilidad interindividual e interpretación clínica, habían sido ampliamente demostrados; sin embargo, factores como las interacciones genéticos-ambientales e inhibiciones por medicamentos, no se sabía en qué medida afectaban a la actividad enzimática del CYP2D6 y cuánto de perjudicial podían ser en el tratamiento de cáncer de mama. Es verdad que Crewe y col. ⁽¹⁰²⁾ publicaron en 1992 que los Inhibidores Selectivos de Recaptación de Serotonina (IRSS), como la paroxetina, inhibían la enzima CYP2D6; no obstante, sería en 2006, cuando Borges y col. ⁽¹²²⁾ estudiaron el efecto de los IRSS respecto al metabolismo del tamoxifeno y el genotipo CYP2D6. Observaron una gran variabilidad interindividual en las concentraciones de endoxifeno.

En 2007, Goetz y col. ⁽¹⁷²⁾ concluyeron que pacientes portadoras del genotipo CYP2D6*4 con baja actividad metabólica o el uso de los IRSS, eran predictores de un mal pronóstico. Goetz nos volvió a ilustrar de la trascendencia del gen CYP2D6, y su importancia en el estudio farmacogenético de la paciente en tratamiento con tamoxifeno.

En 2011, Madlenskiy y col. ⁽⁶³⁾ fueron los primeros en publicar la relación entre polimorfismos CYP2D6, concentraciones de endoxifeno y resultados de cáncer de

mama en un grupo de 1.370 pacientes RE (+) tratadas con tamoxifeno como adyuvante. Aquellas mujeres que presentaban concentraciones de endoxifeno por encima de un umbral de 15nM (5,6ng/mL)^r parecían tener un 26% de riesgo menor de recurrencia de la enfermedad. Ni el tamoxifeno ni otros metabolitos principales estaban asociados con dicho riesgo, excepto el endoxifeno. Esto es muy importante, ya que define por primera vez un umbral terapéutico mínimo de endoxifeno para valorar la eficacia del tamoxifeno.

Además, se demostró que un aumento de 20mg a 40mg incrementaba las concentraciones de endoxifeno, en aquellas variantes CYP2D6 con fenotipo MI y MP, a niveles casi iguales que los ME, por lo que un ajuste de dosis podía compensar la deficiencia metabólica ^(66, 67).

En 2013, Hawse y col. ⁽¹⁷³⁾ publicaron que los perfiles de expresión génica en células MCF7 de cáncer de mama eran diferentes según fuesen tratadas con endoxifeno y 4-hidroxi-tamoxifeno, siendo en el caso del endoxifeno dependientes de su concentración. Ello significa tener que prescribir una dosis eficaz para alcanzar un umbral óptimo.

En este mismo año, Gong y col. ⁽¹⁷⁴⁾, en un estudio in vitro con células de cáncer de mama MCF7, determinaron la concentración de 53nM (19,8 ng/mL) de endoxifeno como clínicamente eficaz para producir una óptima supresión del tumor. Teft y col. ⁽⁸³⁾ marcarían un umbral mínimo de 18nM (6.7ng/mL) de endoxifeno para determinar una sub-óptima terapia con tamoxifeno. Dato este último muy parecido al dato previo de Madlensky y col. ⁽⁶³⁾, que revelaron un cut-off de 15nM (5,6 ng/mL). Además, identificaron la vitamina D como factor ambiental que, tras aumentar en sangre, modulaba positivamente la concentración de endoxifeno a través del gen CYP3A4.

^r Considerando un peso molecular de 373,4933.

En 2013, Love y col. ⁽¹⁴⁷⁾ estudian la relación entre concentración de endoxifeno, genotipos CYP2D6 y la recurrencia de cáncer de mama en un grupo de 48 mujeres asiáticas. Sugirieron que hay un rango óptimo de endoxifeno para alcanzar efectos favorables como terapia adyuvante. Sus datos fueron consistentes con publicaciones anteriores, pero sorprendentemente observaron que el 25% de las pacientes presentaban recurrencia de cáncer de mama con niveles de endoxifeno >70ng/mL.

En 2015, Saladores y col. ⁽⁶⁵⁾ examinaron los resultados clínicos de 306 pacientes premenopáusicas de diferentes grupos poblacionales, con el metabolismo de tamoxifeno y los genotipos CYP3A5, CYP2C9, CYP2C19 y CYP2D6. Sus datos estaban en línea con la publicación de Madlenskiy y col. ⁽⁶³⁾. Concluyeron que la formación de endoxifeno dependía del CYP2D6. Bajas concentraciones de endoxifeno y baja actividad metabólica de CYP2D6 pronosticaba una vida media más corta libre de recaídas. Sin duda, el establecimiento de estos valores mínimos sub-óptimo, óptimo y máximo de endoxifeno, nos ayudará a considerar una posible ventana terapéutica y evitar posibles efectos adversos.

Desde el descubrimiento del gen CYP2D6, otras familias del citocromo P450 implicadas en las Fases I y II del metabolismo del tamoxifeno han sido identificadas, funcionalmente caracterizadas, y relacionadas con la clínica, pero el uso rutinario de su genotipado todavía requiere de una mayor reflexión acerca de sus posibles aplicaciones. Podríamos decir que, todos los estudios enfocados sobre su efecto genético en el metabolismo del tamoxifeno resultan contradictorios actualmente, y necesitan ser avanzados, por lo que no serán abordados en nuestra experimental.

Un ejemplo de ello es el gen CYP3A5 ^(97, 104, 124, 175), así como el gen CYP3A4 ^(83, 176-178) ya que, siendo este último el más abundante enzima CYP450 en el hígado y metabolizando el 50% de todos los fármacos ⁽¹⁷⁹⁾, su expresión puede variar entre 10

y 100 veces ⁽¹⁸⁰⁾, y hay pocas evidencias de que estos polimorfismos tengan consecuencias clínicas en el tratamiento de cáncer de mama.

1.6 MARCO NORMATIVO. DISPOSICIONES LEGALES EXISTENTES.

Una exhaustiva revisión bibliográfica cruzando palabras clave como farmacogenética, medicina personalizada, CYP2D6, consentimiento informado, legislación, aspectos legales, riesgos médico-legales y cáncer de mama, entre otras, parece indicar que los aspectos médico-legales están desdibujados o al menos no bien indicados. Por ello, entendemos que la regulación médico legal de la Farmacogenética es todavía un área en desarrollo, a pesar de que esta disciplina constituye uno de los pilares de la denominada medicina personalizada y de precisión.

Las pruebas genéticas, practicadas en esta tesis, están diseñadas para estudiar las variaciones en la secuencia del ADN genómico relacionadas con la variabilidad interindividual en la respuesta a un medicamento. Por lo que, desde un punto de vista ético, legal y social, nada tienen que ver con la modificación génica o la transferencia de material genético que se practican en la terapia génica, ingeniería genética o clonación; y tampoco con aquellas otras pruebas genéticas altamente predictivas de padecer una enfermedad grave ⁽¹⁸¹⁾. Pruebas genéticas, estas últimas, que se cuestionen al entender que existen consideraciones éticas, legales y sociales colaterales para el paciente, así como para familiares que pudiesen heredar dicha mutación. La confidencialidad de los datos genéticos, así como su repercusión en el empleo y las pólizas de seguros sanitarios son algunos de los aspectos que preocupan a los afectados. Situación que, como hemos comentado, no se ajusta a la casuística de esta tesis doctoral, en la que se analiza el polimorfismo del gen CYP2D6 y su influencia en el metabolismo del tamoxifeno.

Por todo ello, consideramos necesario recordar las consideraciones legales y administrativas en lo que se refiere a medicamentos y sus análisis farmacogenéticos, además de recoger el marco legislativo al que está sujeto la investigación biomédica, junto con la legislación sobre la protección de datos personales, entendiendo que todo ello constituye el marco legislativo actual, dentro del cual se está desarrollando la farmacogenética.

1.6.1 MARCO NORMATIVO SOBRE MEDICAMENTOS.

La Comunidad Económica Europea, en enero de 1965, publicó la Directiva 65/65/CEE del Consejo ^s, la primera relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas sobre especialidades farmacéuticas. Se inició con ella la armonización entre los Estados miembros, en lo que a los medicamentos se refiere, siguiendo los fundamentos constitutivos de la Unión Europea recogidos en el Tratado de Roma de 1957. Su objetivo era la salvaguarda de la salud pública, sin obstaculizar el desarrollo de la industria farmacéutica ni los intercambios de productos farmacéuticos. Desde entonces, la Comunidad Económica Europea, a instancia reiterada de la Organización Mundial de la Salud, desarrolló una intensa actividad de armonización sobre las especialidades farmacéuticas mediante promulgación de numerosas Directivas reguladoras; las cuales, en aras de una mayor racionalidad y claridad, se reagruparon en un texto único, el "Código comunitario sobre medicamentos para uso humano", conocido como Directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo y Consejo [†]. En España, los

^s Directiva del Consejo de 26 de enero de 1965 relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas, sobre especialidades farmacéuticas (65/65/CEE). Diario Oficial Comunidades Europeas, 9 de febrero de 1965, 13/Vol.01, 18-22.

[†] Directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 6 de noviembre de 2001 por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos para uso humano. Diario Oficial de Comunidades Europeas L311, 28 de noviembre de 2001, pag. 67-127.

compromisos de equiparación con las exigencias comunitarias se incorporaron a nuestra legislación más lentamente. La Ley 25/1990 ^u del Medicamento, del 20 de diciembre, inició el proceso de armonización. Ley del Medicamento que se completaría más adelante con el Real Decreto 561/1993 ^v, estableciéndose los requisitos para la realización de ensayos clínicos con medicamentos. El ordenamiento jurídico interno de la Directiva 2001/20/CE ^w, fue incorporado en su totalidad, en España, a través del R.D. 223/2004^x, el cual vino a sustituir al R.D. 561/1993. Aquí, se definieron los Comités Éticos de Investigación Clínica (CEIC) como los responsables de evaluar los aspectos metodológicos, éticos y legales de los ensayos clínicos con medicamentos. Nada refería a la Farmacogenética; aunque sí, se recogieron los principios básicos de la Declaración de Helsinki, de 1964, así como del Convenio de Oviedo de 1997 sobre los derechos humanos y la biomedicina.

La Declaración de Helsinki^y establece que cualquier protocolo experimental en seres humanos, con medicamentos o no, debe enviarse para su consideración y su aprobación, a un comité de evaluación ética especialmente designado e

^u Ley 25/1990, de 20 de diciembre, del Medicamento. Boletín Oficial del Estado núm. 306, sábado 22 de diciembre de 1990, pág. 38228-38246.

^v Real Decreto 561/1993, de 16 de abril, por el que se establecen los requisitos para la realización de ensayos clínicos con medicamentos. Boletín Oficial del Estado núm. 114, jueves 13 mayo 1993, pag. 14346-14364.

^w Directiva 2001/20/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 4 de abril de 2001, relativa a la aproximación sobre la aplicación de buenas prácticas clínicas en la realización de ensayos clínicos de medicamentos de uso humano. Diario Oficial de las Comunidades Europeas de 1 mayo de 2001, nº L121, pág. 34-44.

^x Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos. Boletín Oficial del Estado núm. 33, de 7 febrero 2004.

^y Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Adoptada por la 18ª Asamblea Médica Mundial. Helsinki. Finlandia junio de 1964 y posteriores revisiones hasta 2013. www.wma.net

independiente de cualquier tipo de influencia indebida. El Convenio de Oviedo^z se refiere de una forma más amplia a la aprobación de las investigaciones, debiendo ser un cuerpo competente e independiente, responsable de la revisión sobre la pertinencia científica, importancia del objetivo y estudio en el plano ético.

La Directiva 2004/27/CE ^{aa} del Parlamento Europeo y del Consejo, de 31 de marzo de 2004, se incorpora a nuestro ordenamiento jurídico, a través de la Ley 29/2006 ^{bb}, de 26 de julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. Además, se aseguró la armonización de nuestra normativa con respecto al Reglamento (CE) n°726/2004 ^{cc}, por el que se establecían los procedimientos comunitarios para la autorización y el control de los medicamentos de uso humano y veterinario, y por el que se creaba la Agencia Europea de Medicamentos. Dicha ley 29/2006 sería modificada por la ley 28/2009, de 30 diciembre, y por la Ley 10/2013, de 24 de julio. Así, se incorporó al ordenamiento jurídico español las Directivas 2010/84/UE referida a farmacovigilancia, y Directiva 2011/62/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, quedando derogada la ley 29/2006 excepto en sus disposiciones finales segunda, tercera y cuarta.

^z Instrumento de Ratificación del Convenio para la protección de los derechos humanos y la dignidad del ser humano con respecto a las aplicaciones de la Biología y la Medicina (Convenio relativo a los derechos humanos y la biomedicina), hecho en Oviedo el 4 de abril de 1997. Boletín Oficial del Estado núm.251, miércoles 20 octubre 1999, pág. 36825-36830.

^{aa} Directiva 2004/27/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de marzo de 2004, que modifica la Directiva 2001/83/CE por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos de uso humano. Diario Oficial de la Unión Europea, n° L136, de 30 abril 2004, pág. 34-57.

^{bb} Ley 29/2006, de 26 de julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. Boletín Oficial del Estado núm. 178, jueves 27 julio 2006, pág. 28122-28165.

^{cc} Reglamento (CE) n°726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de marzo 2004, por el que se establecen procedimientos comunitarios para la autorización y el control de los medicamentos de uso humano y veterinario y por el que se crea la Agencia Europea de Medicamentos. Diario Oficial de la Unión Europea, n° L136, de 30 abril de 2004, pág. 1-33.

Tal y como se extrae del último Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios, tampoco hubo referencias a la Farmacogenética; eso sí, en su Título III, artículo 58, define de una forma amplia el ensayo clínico como toda investigación efectuada con el fin de detectar las reacciones adversas de un medicamento, y establece que serán diseñados, realizados y comunicados de acuerdo con las Normas de Buena Práctica Clínica; y en su artículo 60, obliga a que se realicen en condiciones de respeto a los derechos fundamentales de la persona y a los postulados éticos que afectan a la investigación biomédica en la que resultan afectados seres humanos, siguiéndose a estos efectos los contenidos en la Declaración de Helsinki y cualesquiera otros instrumentos internacionales.

El 16 de abril de 2014, se aprobó el Reglamento (UE) N° 536/2014^{dd} del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre los ensayos clínicos de medicamentos de uso humano. Sin embargo, no ha incluido ningún aspecto particular sobre investigaciones genéticas, salvo la de mantener la prohibición explícita de la Directiva 2001/20/CE de realizar ensayos de terapia génica que modifiquen la identidad genética de la línea germinal de un individuo. Esta directiva europea todavía no ha sido incorporada a nuestro ordenamiento jurídico, ya que requiere del desarrollo de un portal único para la Unión Europea y se estima su aplicación para 2019.

Podemos constatar que, acorde a la legislación del medicamento consultada hasta la actualidad, la palabra Farmacogenética no fue promulgada, y sólo fue considerada en noviembre de 2002 por el Committee for Proprietary Medicinal

^{dd} Reglamento (UE) N° 536/2014 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de abril de 2014, sobre los ensayos clínicos de medicamentos de uso humano, y por el que se deroga la Directiva 2001/20/CE. Diario Oficial de la Unión Europea, n° L158, de 27 mayo de 2014, pág. 1-76.

Products (CPMP) de la Agencia Europea del Medicamento, como un activo técnico útil para las autoridades regulatorias, comités éticos, profesionales de la salud y pacientes, cuando tengan que enfrentarse con protocolos que utilizan pruebas genéticas, y documentos como el consentimiento informado en ensayos clínicos con medicamentos^{ee}. Guía técnica cuya terminología fue muy útil, más cuando por estas fechas, no existía un consenso en la literatura sobre las definiciones de Farmacogenética y Farmacogenómica. En realidad, los términos se utilizaban y se utilizan con frecuencia indistintamente en la comunidad científica.

Así mismo, a este respecto, también resaltar la postura de reflexión adoptada por el Comité de Productos Médicos para Uso Humano (Committee for Medical Products for Human Use, CHMP) de la Agencia Europea del Medicamento (European Medicines Agency) de Londres^{ff} en mayo de 2007. Reconocen el rápido desarrollo de la genética a raíz de las diferencias interindividuales en la acción del fármaco, y se destaca el citocromo P450, en especial el CYP2D6, dada su penetrancia a nivel del metabolismo del fármaco.

Actualmente, la Sociedad Española de Farmacogenética y Farmacogenómica (SEFF) afirma que un 34% de los medicamentos tienen ficha técnica con biomarcadores genéticos identificados, en mayor o menor medida, con los polimorfismos del citocromo P450, siendo el CYP2D6 el más investigado por metabolizar el 25% de los fármacos actuales. En noviembre de 2007, se aprobó por la CHMP una guía referente a definiciones de biomarcadores genéticos,

^{ee} Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP). EMEA: European Medicines Agency. EMEA/CPMP/3070/01. Position paper on terminology in pharmacogenetics. Adoption by CHMP November 2002.

^{ff} Committee for medical products for human use (CHMP). Reflection paper on the use of Pharmacogenetics in the pharmacogenetic evaluation of medical products. Adoption by CHMP in May 2007.

farmacogenómica, farmacogenética, datos genómicos y codificación de las muestras⁹⁹.

En abril de 2008, la Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos, publicó una guía similar a la CHMP ^{hh}, y en agosto de 2011, publicó una guía referente a biomarcadores relacionados con medicamentos o desarrollo de la biotecnología del productoⁱⁱ.

Desde 2013 hasta la actualidad pocos cambios legales en nuestro ordenamiento jurídico, relacionados con el objeto de esta tesis y relacionados con los medicamentos, han de ser considerados. Es verdad que la legislación europea, ha tenido una constante preocupación legal en lo que refiere a los medicamentos, por lo que ha evolucionado significativamente desde 1965, pudiéndose constatar una armonización entre los Estados miembros de la Unión Europea. Ahora bien, el Reglamento último (UE) N° 536/2014 del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre los medicamentos de uso humano, nada refiere sobre la necesidad de advertir, en las fichas técnicas y folletos internos de los medicamentos, la realización de los análisis farmacogenéticos en la práctica clínica en aquellos medicamentos que puedan experimentar una disminución de su eficacia terapéutica por causa genética. Por todo ello, se entiende que la Farmacogenética, como disciplina que puede ayudar clínicamente a la hora de prescribir el fármaco, no se regula legalmente en este contexto y es todavía un área por desarrollar.

⁹⁹ EMEA/CHMP/ICH/437986/2006: ICH Topic E15 Definitions for genomic biomarkers, pharmacogenomics, pharmacogenetics, genomic data and sample coding categories. European Medicines Agency. November 2007. European.

^{hh} Guidance for Industry E15 Definitions for Genomic Biomarkers, Pharmacogenomics, Pharmacogenetics, Genomic Data and Sample Coding Categories. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Evaluation and Research. Center for Biologics Evaluation and Research. April 2008. ICH.

ⁱⁱ Food and Drug Administration, HHS. International Conference on Harmonisation; Guidance on E16 Biomarkers Related to Drug or Biotechnology Product Development: Context, Structure, and Format of Qualification Submissions; availability. Notice. Fed Regist. 2011 Aug 11;76(155):49773–4.

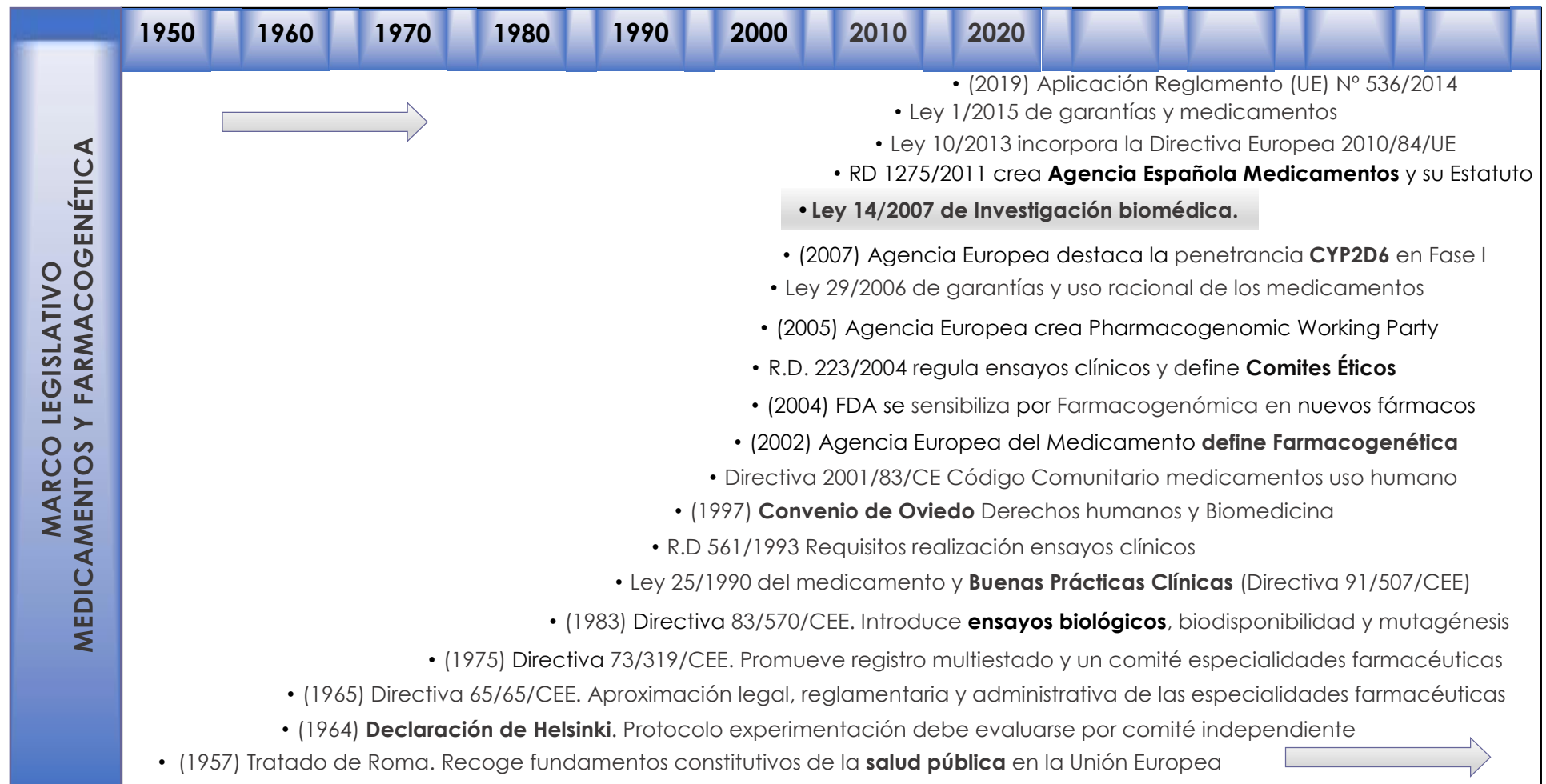


Figura 9. Cronograma en décadas hasta la actualidad del marco legal más significativo referido a medicamentos. Evidencia una constante preocupación, adaptándose a las nuevas tendencias tecnológicas, hasta el punto de que la norma legal está latente incluso en la medicina personalizada y de precisión como promulga La Ley 14/2007. Permite los análisis farmacogenéticos si existen diferencias interindividuales en la respuesta al tratamiento con un medicamento.

1.6.2 MARCO NORMATIVO SOBRE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA: LEY 14/2007.

Las investigaciones genéticas en biomedicina, según se recoge en la Ley 14/2007^{jj}, de 3 de julio, de nuestro ordenamiento jurídico, deben cumplir con las recomendaciones internacionales aplicables a cualquier investigación con seres humanos, ya indicado en la Declaración de Helsinki y, más ampliamente, en el Convenio de Asturias de Bioética del Consejo de Europa para la protección de los derechos humanos y la dignidad del ser humano respecto a la aplicación de la biología y la medicina, del 4 de abril de 1997, y ratificado en España el 23 de julio de 1999^{kk}.

Esta ley de investigación biomédica establece normas en ámbitos no regulados hasta la fecha, y tiene como uno de sus ámbitos de aplicación, la realización de análisis genéticos y el tratamiento de sus datos; así como, la investigación de carácter básico y clínico.

Todo lo referido se incardina en un contexto de relación entre la investigación básica con la medicina clínica que implica un trabajo multidisciplinar que requiere, coordinar equipos de trabajo y cooperación profesional como recoge el Manual de Ética y Deontología Médica^{ll}, así como definir protocolos para que el médico responsable pueda decidir a través del ejercicio de deliberación los criterios de indicación, manejo e interpretación de las pruebas genéticas, en nuestro caso farmacogenéticas.

^{jj} Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica. Boletín Oficial del Estado núm. 159, miércoles 4 julio 2007, pág. 28826-28848.

^{kk} Ratificación del Convenio para la protección de los derechos humanos y la dignidad del ser humano con respecto a las aplicaciones de la Biología y la Medicina, de 20 de octubre de 1999; BOE nº 251.

^{ll} Manual de Ética y Deontología Médica. Editado por la Organización Médica Colegial de España. ISBN: 978-84-616-0252-0. Capítulo VIII. Las relaciones de los médicos entre sí y con otros profesionales de la salud; página 151.

En el artículo 3 de la ley de Investigación biomédica, se define el análisis genético como el procedimiento destinado a detectar variantes génicas; y se define el consejo genético como aquel procedimiento destinado a informar a una persona sobre los resultados de un análisis genético. La delimitación del análisis de variantes genéticas queda regulada en sus artículos 9 y 46, pudiéndose realizar pruebas predictivas de variantes genéticas, exclusivamente, para el estudio de las diferencias inter-individuales en la respuesta a los fármacos y las interacciones genético-ambientales, que puedan condicionar la respuesta a un tratamiento concreto. El objeto y ámbito de aplicación será exclusivamente dentro del ámbito sanitario, tal y como establece su artículo 1, apartado 2.

Es obvio que los resultados obtenidos de un análisis genético deben respetar la legislación sobre la protección de datos personales ^{mm}. La protección de las personas físicas en relación con el tratamiento de datos personales es un derecho fundamental.

La Carta de los Derechos Fundamentales de la Unión Europea ⁿⁿ, en el artículo 8, apartado 1, establece que toda persona tiene derecho a la protección de los datos de carácter personal que le conciernan, y en este sentido, debemos resaltar el nuevo Reglamento 2016/679 del Parlamento Europeo y del Consejo, que según su artículo 99, entra en vigor el 25 de mayo de 2018.

Así mismo, la ley de Investigación biomédica, en su Título V, aborda los requisitos que deben cumplir quienes realicen análisis genéticos y traten datos genéticos de carácter personal. Su incumplimiento será objeto de sanciones administrativas, sin

^{mm} Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de abril de 2016, relativo a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales y a la libre circulación de estos datos y por el que se deroga la Directiva 95/46/CE (Reglamento general de protección de datos).

ⁿⁿ Carta de los derechos fundamentales de la Unión Europea (2000/C 364/01). Diario Oficial de las Comunidades Europeas; C 364/1; 18.12.2000

perjuicio de las responsabilidades civiles, penales o de otro orden que puedan concurrir.

En conclusión, esta ley recoge y facilita en su articulado, la aplicación de la Farmacogenética como disciplina, pudiéndose estudiar genéticamente la variabilidad interindividual en la respuesta a un medicamento. Por ello, podemos decir que no existe ninguna delimitación en el marco legal para el desarrollo del análisis de polimorfismos del gen CYP2D6 en la hormonoterapia individualizada con tamoxifeno en pacientes con cáncer de mama.

2. JUSTIFICACIÓN

Los avances de la Farmacogenética y la conveniencia de su aplicación en el ejercicio de una medicina proactiva, acuñada por el autor Lee Hood como medicina P4 o de las cuatro "P" de predictiva, preventiva, personalizada y participativa ^(1, 223-225), así como la disposición de la Ley 14/2007 en el ámbito de la investigación biomédica para el estudio de las diferencias genéticas interindividuales en la respuesta a los fármacos, nos permite intuir que en breve plazo se irá incorporando de forma paulatina a la actividad asistencial el informe farmacogenético, obligatorio y previo al inicio de los tratamientos de pacientes crónicos o polimedicados, a fin de evitar un riesgo de tratamiento sub-óptimo y prevenir efectos adversos, todo ello en el contexto de una asistencia sanitaria de calidad y coste-efectiva.

El gen CYP450 juega un papel importante en la metabolización de muchos fármacos ^{oo}, por lo que su genotipado proporciona una herramienta potencial para ayudar en la prevención de reacciones no deseadas. La identificación de un fenotipo metabolizador con actividad metabólica deficiente antes de la terapia con un fármaco permitiría evitar posibles reacciones adversas.

El gen CYP2D6 (OMIM 124030 con localización citogenética 22q13.2) transcribe una enzima monoxigenasa responsable del metabolismo en la Fase I de un amplio número de medicamentos ⁱⁱ tipo antidepresivos, betabloqueantes, antipsicóticos antiarrítmicos y antineoplásicos antiestrogénicos como el tamoxifeno, entre otros. No

^{oo} Flockhart DA. Drug Interactions: Cytochrome P450 Drug Interaction Table. Indiana University School of Medicine Department of Medicine. Clinical Pharmacology. La tabla está diseñada como una herramienta de referencia para médicos. Contiene listas de medicamentos en columnas bajo la designación de isoformas específicas del citocromo P450; es decir, aparece un medicamento en una columna si hay evidencia publicada de que se metaboliza, al menos en parte, a través de esa isoforma. No necesariamente se deduce que la isoforma es la vía metabólica principal in vivo, o que las alteraciones en la velocidad de la reacción metabólica catalizada por esa isoforma tendrán grandes efectos sobre la farmacocinética del fármaco. <http://medicine.iupui.edu/clinpharm/ddis/clinical-table>.

obstante, a pesar del reconocimiento de su importancia y su estudio cada vez más frecuente en los ensayos clínicos, no se utiliza en medicina clínica el análisis de la actividad metabólica de la enzima CYP2D6, y raramente se pide su genotipado, a pesar de que se considera una alternativa válida para predecir el estado metabólico ⁽³⁹⁾ del paciente durante el tratamiento. En gran medida, esto puede atribuirse al elevado número de alelos CYP2D6, sus distribuciones y frecuencias variantes en diferentes grupos poblacionales. Diseñar una estrategia de genotipado en el laboratorio de análisis, basada en la casuística de las variantes genéticas más frecuentes con actividad metabólica anómala, condicionada a la frecuencia en la población asistencial de referencia, y adaptable a una casuística pequeña con un coste efectivo, es recomendable.

La información obtenida de la bibliografía consultada nos permite constatar que en nuestra Comunidad Autónoma de Madrid (CAM), no hay estudios previos sobre la variabilidad y frecuencia poblacional de los diferentes polimorfismos CYP2D6 y de forma particular en mujeres, a priori, candidatas a padecer cáncer de mama. Tampoco constatamos la existencia de un método de análisis genético comercial que permita estudiar en batería las variantes genéticas con actividad metabólica reducida.

Entendemos que, en virtud de la bibliografía revisada y nuestra experiencia profesional, esta metodología de estudio aplicada a pacientes que padecen o pueden padecer cáncer de mama puede constituir un método de trabajo con aplicación en la práctica asistencial y que además puede extrapolarse a otros fármacos dependientes metabólicamente del CYP2D6, especialmente en los casos de pacientes crónicos

Así mismo, esta metodología aplicada en un estudio con pacientes con cáncer de mama permitirá identificar los polimorfismos CYP2D6 y, dado que la enzima CYP2D6 tiene una función dominante en la bioactivación del tamoxifeno, asociarlos con los niveles en plasma de tamoxifeno y sus metabolitos (N-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno y endoxifeno) para identificar pacientes en riesgo de tratamiento sub-óptimo con tamoxifeno. Todo ello para finalmente proponer una estrategia de análisis farmacogenético previo al tratamiento, que enfatizará la importancia de un informe farmacogenético como modelo innovador en el marco de la medicina asistencial a incluir en la historia clínica del paciente.

El informe farmacogenético evidencia nuevos aspectos médico-legales relacionados con la información al paciente, el consentimiento informado y el ejercicio de deliberación, entre otros, determinantes para una adecuada toma de decisiones en el desarrollo de la medicina personalizada y de precisión.

3. HIPÓTESIS

3. HIPÓTESIS

El estudio biopatológico de las mujeres que padecen cáncer de mama, en tratamiento con tamoxifeno, justifica la necesidad de realizar informes farmacogenéticos, que se incorporen a la historia clínica de la paciente.

4. OBJETIVOS

Los objetivos de investigación que se propone alcanzar en esta tesis doctoral son:

1. Identificar en una población femenina de la Comunidad Autónoma de Madrid, la distribución de los polimorfismos del gen CYP2D6, especialmente los que puedan implicar una actividad metabólica reducida.
2. Estudiar los polimorfismos del gen CYP2D6 en un grupo de pacientes con cáncer de mama en tratamiento con tamoxifeno, así como los niveles plasmáticos del fármaco y sus metabolitos.
3. Proponer una estrategia de análisis farmacogenético del gen CYP2D6 y niveles plasmáticos de tamoxifeno y sus metabolitos.
4. Proponer un modelo de informe farmacogenético acorde a criterios asistenciales y médico legales.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 GRUPOS DE POBLACIÓN ESTUDIADOS

5.1.1 POBLACIÓN DE REFERENCIA

Es la población total de la Comunidad Autónoma de Madrid (CAM) a la que se espera extrapolar los resultados polimórficos CYP2D6. Refiere, en una primera fase, a muestras de sangre de 384 mujeres caucásicas de la CAM anonimizadas, elegidas al azar, clasificadas en grupos de edades comprendidos entre 15 y más de 75 años. Tamaño muestral que, en una segunda fase, fue ampliado hasta 423 mujeres. Este grupo permitió conocer, gracias a la metodología puesta a punto por nosotros, las frecuencias poblacionales de aquellos polimorfismos genéticos CYP2D6 más frecuentes en la población caucásica con actividad metabólica reducida.

5.1.2 POBLACIÓN DIANA

Es un subgrupo de la población con cáncer de mama en tratamiento con hormonoterapia, el cual debe cumplir los criterios de inclusión según siguiente apartado. Refiere a muestras de sangre extraídas, previo consentimiento informado, de 100 mujeres tratadas en el Centro de Patología de la Mama Fundación Tejerina. Este grupo permitió asociar los niveles de tamoxifeno y sus metabolitos con cada uno de los polimorfismos CYP2D6 analizados, e identificar aquellas pacientes con niveles de endoxifeno bajos durante el tratamiento. Esta asociación biomolecular permitió cuestionarse si un informe farmacogenético en la medicina personalizada y de precisión actual podría considerarse como un modelo innovador necesario clínicamente ante un posible tratamiento sub-óptimo.

5.1.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Con el objetivo de que la selección de esta población diana fuese lo más homogénea posible a fin de evitar sesgos, los pacientes incluidos en el estudio debían cumplir con los criterios siguientes:

- ✓ Mujeres con edades comprendidas entre los 15 y >75 años.
- ✓ Grupo caucásico de nacionalidad española.
- ✓ Pre y postmenopáusicas.
- ✓ Diagnosticadas de cáncer de mama.
- ✓ Tumores con receptores estrogénicos positivos.
- ✓ Tratadas con tamoxifeno durante un mínimo de 4 meses.

Para estudiar la media de los niveles metabólicos de tamoxifeno de pacientes CYP2D6*1 metabólicamente normales, se excluyeron aquellas muestras cuyo nivel de endoxifeno era inferior a 6 ng/mL por entender que, o bien no ha podido transcurrir un mínimo de 4 meses desde el inicio del tratamiento y no se ha alcanzado la fase estacionaria de los metabolitos primarios N-D-TAM y 4-OH-TAM, o bien existe otro factor genético, medio ambiental o farmacológico que pudiera interferir en el metabolismo del tamoxifeno.

5.1.4 CÁLCULO TAMAÑO MUESTRAL

Para calcular el número de pacientes necesario para alcanzar los objetivos del estudio, se tuvo presente una serie de consideraciones que se describen a continuación.

Según estadísticas poblacionales cerradas del INE (Instituto Nacional de Estadística) en 2011, había una población de 2.846.264 mujeres en la CAM, de las cuales 1.972.131 tenían edades comprendidas en el rango de edad antes establecido. Rango que representa el 69% sobre el total de mujeres de la CAM.

Al no saber fehacientemente la población en 2017, aceptamos un margen de error del 5%, de forma que nuestra población podría estar entre el 64-74% con respecto al 2011, es decir entre 1.829.863 y 2.114.489 mujeres. Así pues, el porcentaje de polimorfismos CYP2D6 encontrados en la población de referencia debería estar

representada en su mayoría en este margen de error calculado (64-74%) y para un nivel de confianza del 95%.

Estudios preliminares propios, realizados sobre una población de 130 mujeres, mostraron que más de un 50% presentaban el genotipo nativo homocigoto CYP2D6*1 clasificado fenotípicamente con actividad metabólica normal. Por tanto, aceptamos una heterogeneidad para la población de mujeres de la CAM del 50%.

El Teorema del Límite Central o Campana de Gauss para un tamaño de población superior a 100.000 mujeres, aplica la fórmula:

$$n = [Z^2 \cdot p \cdot (1-p)] / e^2$$

donde "Z" vale 1,96 para un nivel de confianza del 95%, "e" es el error aceptado (0,05), "p" la proporción que esperamos encontrar (0,5), y "n" el tamaño muestral de mujeres de la CAM. El resultado de esta fórmula nos llevó a procesar, en una primera fase, 384 muestras de sangre de mujeres caucásicas de la CAM; cantidad que fue aumentada en una segunda fase hasta 423 mujeres. Así mismo, se estudió un número de pacientes en tratamiento con tamoxifeno, limitándose a un máximo de cien.

5.2 CONSENTIMIENTO INFORMADO Y HOJA RECOGIDA DE DATOS

Se detalla en los anexos I y II la información proporcionada por escrito al paciente comprendiendo la naturaleza, importancia implicaciones y riesgos de la investigación en los términos que establece la Ley 14/2007 de Investigación biomédica. El anexo III muestra la hoja de recogida de datos del paciente en la consulta.

5.3 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Para la población de referencia, mujeres anonimizadas de la CAM, se obtuvo en primer lugar un total de 384 muestras de sangre con anticoagulante EDTA, a fin de

analizar las frecuencias poblacionales de los polimorfismos del gen CYP2D6 asociados a una baja actividad metabólica. No obstante, en base a los resultados obtenidos se decidió aumentar hasta 423 muestras. En la población diana, pacientes con cáncer de mama del Centro de la Mama Fundación Tejerina, previa prestación del consentimiento, se obtuvieron las muestras de sangre en dos tubos, uno sin anticoagulantes y otro con EDTA, ambos extraídos por venopunción en los controles analíticos de la paciente. El tubo sin anticoagulantes permitió separar el suero por centrifugación a 1500g durante 10 minutos, el cual fue alicuotado en volúmenes de 500µL en tubos eppendorf de polipropileno y congelados a -20°C hasta poder realizar la cuantificación cromatográfica de tamoxifeno y sus metabolitos. El tubo con EDTA fue utilizado para la extracción de ADN, el cual fue centrifugado a 3000g durante 10 minutos. El sedimento con los restos celulares fue alicuotado y congelado en las mismas condiciones que las muestras de suero, hasta realizar la extracción de ADN genómico.

5.4 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

Existen diferentes métodos publicados y comerciales para la extracción de ADN, basándose todos ellos en los mismos fundamentos y siempre con un fin único, causar el menor daño posible en la hebra de ADN. Ahora bien, no sólo es importante la calidad y cantidad del ADN obtenido, también es clave el paso de la purificación a fin de eliminar en todo lo posible las proteínas y sales existentes. Preparaciones de ADN genómico con una mala calidad puede dar excelentes resultados en una PCR corta con fragmentos de ADN inferiores de 900pb, pero no cuando se requiere trabajar con un gen de tamaño grande, como es en nuestro caso. Así pues, la calidad y pureza del ADN fueron factores limitantes cuando se

necesitó genotipar el gen CYP2D6 de casi 5Kb, requiriéndose de un ADN no degradado, libre de contaminantes.

En un principio, cuatro métodos manuales de extracción fueron ensayados para extraer ADN genómico de un sedimento con restos celulares de sangre periférica. Tres de ellos se basaban en kits comerciales: Pure Link™ Genomic DNA Mini Kit de la empresa Invitrogen, n° catálogo K1820-00DNA; Isolation Kit for Mammalian Blood de la empresa Roche, n° catálogo 11 667 327 001; G-spin™ Total DNA Extracction kit de la empresa iNtRON Biotechnology, n° catálogo 17045; y un cuarto método manual, basado en una lisis con detergente SDS 10% y proteinasa K 20mg/mL, seguido de una purificación con Fenol/Cloroformo/Isoamílico 25:24:1, y separación por gradiente de densidad con lubricante de silicona inerte autoclavable ⁽³⁸⁾. Por la calidad y cantidad de ADN obtenido, se decidió utilizar el kit de Invitrogen al ser el único que permitió poner a punto las técnicas de PCR larga y ARMS (Amplification Refractory Mutation System), las cuales se describen más adelante. Los otros métodos de extracción dieron resultados variables, generando aleatoriamente sólo unos pocos ensayos de PCR larga satisfactorios.

El procedimiento seguido se ajustó según indicaciones del fabricante Invitrogen. En un tubo eppendorf estéril de 1.5ml, se adicionaba 20µL de proteinasa K (20mg/mL), 200µL de sangre y 20µL de RNasa (20mg/mL). Se mezclaba con vórtex y se incubaba a temperatura ambiente durante 2 minutos. A continuación, se dispensaba 200µL del tampón de lisis PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer y se mezclaba con vórtex hasta obtener una solución homogénea, la cual era incubada durante 10 minutos en un baño en seco a 55°C para digerir las proteínas. Por último, antes de la fase de purificación, se añadía 200µL de etanol absoluto, mezclándose con vórtex hasta obtener una solución homogénea.

La purificación del ADN genómico de restos celulares, proteínas y sales, se basó en un procedimiento de centrifugación a través de una columna con una membrana de sílica. Este mecanismo de purificación se fundamentó en la adsorción y desorción de los ácidos nucleicos en presencia de sales caotrópicas. La adición de iones caotrópicos destruía la estructura polar de las moléculas de agua que recubría a los ácidos nucleicos, creándose un entorno hidrofóbico alrededor del ADN. En esta condición hidrofóbica, el ADN se une a la membrana de sílica de la columna, mientras que las proteínas y otros contaminantes son eliminados de la muestra durante los pasos de lavado. El ADN se libera y eluye de la membrana de sílica mediante un tampón de elución ligeramente alcalino de Tris-EDTA con baja concentración de sales, el cual permite recuperar la capa exterior de moléculas de agua en la hebra de ADN desprendiéndose de la sílica.

Todo el lisado anterior, aproximadamente 640µL, fue depositado en la columna de sílica insertada en un tubo de polipropileno de 2mL, el cual fue centrifugado a 10.000g durante 1 minuto a temperatura ambiente. El sedimento recogido en el tubo era eliminado, y la columna transferida a otro tubo limpio. Un volumen de 500µL de una mezcla de hidrocloreuro de guanidina y etanol absoluto (Buffer 1) era añadido en la columna de sílica, la cual era centrifugada de nuevo a 10.000g durante 1 minuto a temperatura ambiente. A continuación, se añadía un volumen de 500µL del Buffer 2 reconstituido en etanol absoluto y se centrifugaba a 10.000g durante 3 minutos a fin de eliminar cualquier resto de etanol y secar al máximo el filtro con el ADN. El tubo era eliminado y la columna era transferida a un tubo eppendorf de 1.5mL nuevo estéril, en el cual se añadía 50µL del tampón de elución (Tris-HCl 10mM, pH 9.0, EDTA 0.1mM). Finalmente, se incubaba durante 1 minuto a temperatura ambiente y luego se centrifugaba a máxima velocidad durante 1

minuto. El tubo de eppendorf contenía así el ADN genómico purificado, el cual se congelaba a una temperatura de -20°C , siendo la columna de sílica desechada.

Esta técnica manual fue posteriormente sustituida por un método automatizado en un equipo Magna Pure Compact (figura 13) de la empresa Roche, que fue puesto a punto según indicaciones del fabricante. Su rapidez y fiabilidad eran óptimas para su aplicación en el laboratorio clínico; no obstante, su alto coste en reactivos merece valorar en el campo de la investigación.

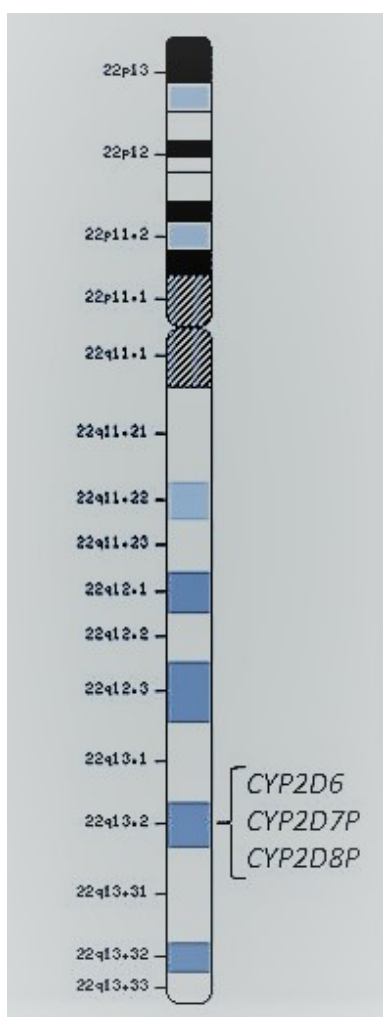
5.5 CUANTIFICACIÓN ADN GENÓMICO

Las moléculas aromáticas de los ácidos nucleicos purinas (timina y citosina) y pirimidinas (adenina y guanina), presentan una absorbancia máxima a 260nm, razón por la que dicha longitud de onda es el estándar para la cuantificación de ADN.

Todos los extractos de ADN fueron cuantificados en un espectrofotómetro modelo Nanodrop® ND-1000 de la empresa Thermo Fisher Scientific Inc., y siempre antes de cada tanda de muestras se realizaba un blanco de muestra. Para ello, se depositaba un volumen de 2 μL de agua destilada en la ventana de cuarzo y se realizaba una corrección de la línea basal a la longitud de onda de 340nm. La cuantificación de ADN fue validada sistemáticamente mediante absorción UV a 260nm, y la pureza del mismo mediante mediciones a 280nm y a 230nm. Un exceso de proteínas y sales caotrópicas disminuye la eficiencia de la PCR, por ello se midió la absorbancia a 280nm porque por lo general es donde las proteínas y compuestos fenólicos tienen una fuerte absorción, y a 230nm porque es la longitud de onda en la que la absorción es máxima para compuestos aromáticos como trizol y sales caotrópicas. La relación de absorbancias A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} se utilizaron para evaluar la pureza de los extractos de ADN. Todos ellos debían presentar un cociente

A260/A280 entre 1.8-2, aunque valores >1.6 fueron consideradas aceptables para nuestra amplificación posterior. Un cociente inferior era indicativo de la presencia de contaminación con efecto en amplificaciones posteriores. En el caso de la ratio A260/230 resultó ser más variable que la relación A260/280, dependiendo de la concentración de ADN y del tampón de elución Tris-EDTA. Valores inferiores a 1.5-2.2 se consideraba que tenía una gran cantidad de contaminantes que podían interferir, en especial, reactivos utilizados en el procedimiento de aislamiento del ADN como eran las sales caotrópicas de guanidina.

5.6 AMPLIFICACIÓN DEL GEN CYP2D6



El gen CYP2D6 (OMIM 124030) abarca la región 22q13.2 localizada en el cromosoma 22, que junto con los pseudogenes flanqueantes CYP2D8 y CYP2D7 es parte del cluster CYP2D.

Dichos pseudogenes presentan una secuencia nucleotídica muy semejante al gen CYP2D6, con la salvedad de que son inactivos, no dando lugar a una enzima funcional ⁽³⁷⁾. En la actualidad, más de 100 alelos CYP2D6 polimórficos son conocidos ^{PP}. Tres de los cuales fueron detectados en el pseudogen CYP2D8 y otros nueve en el pseudogen CYP2D7 ⁽³⁷⁾.

Figura 10. Localización citogenética 22q13.2 del gen CYP2D6 y pseudogenes no funcionales CYP2D7 y CYP2D8 en el cromosoma 22. El gen CYP2D6 se identifica con la referencia OMIM 124030 y coordenadas genómicas GRCh38:22:42,125,530-42,130,880 (NCBI).

^{PP} www.cypalleles.ki.se; aunque, actualmente las bases de datos han sido movidas a la web de Pharmacogene Variation Consortium www.pharmvar.org, donde se dispone del archivo mencionado.

Por ello, a fin de evitar un genotipado erróneo se puso a punto un método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) previamente descrito por Roberts y col. ⁽⁴⁰⁾, aunque con algunas modificaciones. Unos primers diseñados específicamente para amplificar sólo la secuencia única de intrones y exones del gen CYP2D6, y así eliminar los pseudogénes CYP2D8 y CYP2D7, permitió obtener cantidades suficientes del gen CYP2D6 para poder realizar posteriormente una estrategia de genotipado mediante dos PCRs más, definidas como ARMS (Amplification Refractory Mutation System), las cuales permitieron genotipar los polimorfismos CYP2D6 más frecuentes con baja actividad metabólica. El interés en adaptar este método radicaba en que era relativamente rápido y técnicamente factible con la instrumentación existente en el laboratorio de la universidad, eliminaba posibles errores de análisis e incluía los polimorfismos CYP2D6 más frecuentes con baja actividad metabólica, a fin de poder estudiar la frecuencia poblacional en la CAM con un coste económico asumible.

La PCR puesta a punto, se denominó PCR larga, y estaba basada en la repetición de ciclos de síntesis de ADN dirigida por varios oligonucleótidos, denominados técnicamente primers, entre los que resaltan los primers P100 y P200 (figura 11) ya que permitieron realizar la amplificación sólo de la secuencia del gen CYP2D6. Estos primers, así como el resto, fueron sintetizados por la empresa Sigma Life Science y eran complementarios a la zona diana según secuencia actualizada AY545216.1, coincidente a su vez con la publicada por Kimura y col. ⁽³⁷⁾. Esta amplificación seleccionada del gen CYP2D6 del cluster CYP2D, evitó falsas interpretaciones producidas por las secuencias homólogas de los pseudogenes CYP2D8 y CYP2D7. Así mismo, se utilizaron simultáneamente otros primers para buscar la delección del alelo CYP2D6*5 (primers CYP13 y CYP24) y duplicaciones completas del gen CYP2D6 (primers 2D6dupIF y 2D6dupIR).

Se prepararon dos mezclas separadas, las cuales se conservaron durante su utilización en una gradilla congelada a -20°C. La mezcla A llevaba los primers y nucleótidos, mientras que la mezcla B contenía el tampón y la polimerasa. Las dos mezclas fueron unidas en el tubo de amplificación junto con el ADN genómico molde extraído y purificado previamente. Un volumen de reacción final de 25µL, contenía 200µM de cada uno de los dextroribonucleótidos trifosfato (dNTP) complementarios al ADN molde, 200nM de cada uno de los primers P100, P200, CYP13, CYP24, 2D6-duplF y 2D6-duplR (ver secuencias en Tabla 1), 1.6mM de MgCl₂, 1µL de la polimerasa Elongase® de la empresa Invitrogen (N° catálogo 10480-010) y, aproximadamente, entre 100-150ng de extracto de ADN genómico.

Nombre oligonucleótido	Secuencia 5'-3'
P100	GGCCTACCCTGGGTAAGGGCCTGGAGCAGGA
P200	CTCAGCCTCAACGTACCCCTGTCTCAAATGCG
CYP13	ACCGGGCACCTGTACTCCTCA
CYP24	GCATGAGCTAAGGCACCCAGAC
2D6duplF	CCTGGGAAGGCCCCATGGAAG
2D6duplR	CAGTTACGGCAGTGGTCAGCT

Tabla 2. Primers ⁽⁴⁰⁾ PCR larga coincidentes con GeneBank Accesion No M33388, así como AY545216.1. El primer CYP13 está localizado en la región intergénica del pseudogen CYP2D7 y el gen CYP2D6 (GeneBank Accesion No X90926).

Las condiciones programadas en el termociclador Applied Biosystems AB9700 para esta PCR larga fueron: 94°C durante 30 segundos para la desnaturalización inicial de cualquier endonucleasa o exonucleasa que pudiera contaminar la muestra, seguido de 35 ciclos de 94°C durante 30s para la desnaturalización de la doble hebra de ADN y un anillamiento-extensión combinados a 68°C durante 10 minutos (60s por Kb de ADN genómico molde a amplificar), dejándose toda la noche a 4°C hasta poder ser analizadas al día siguiente.

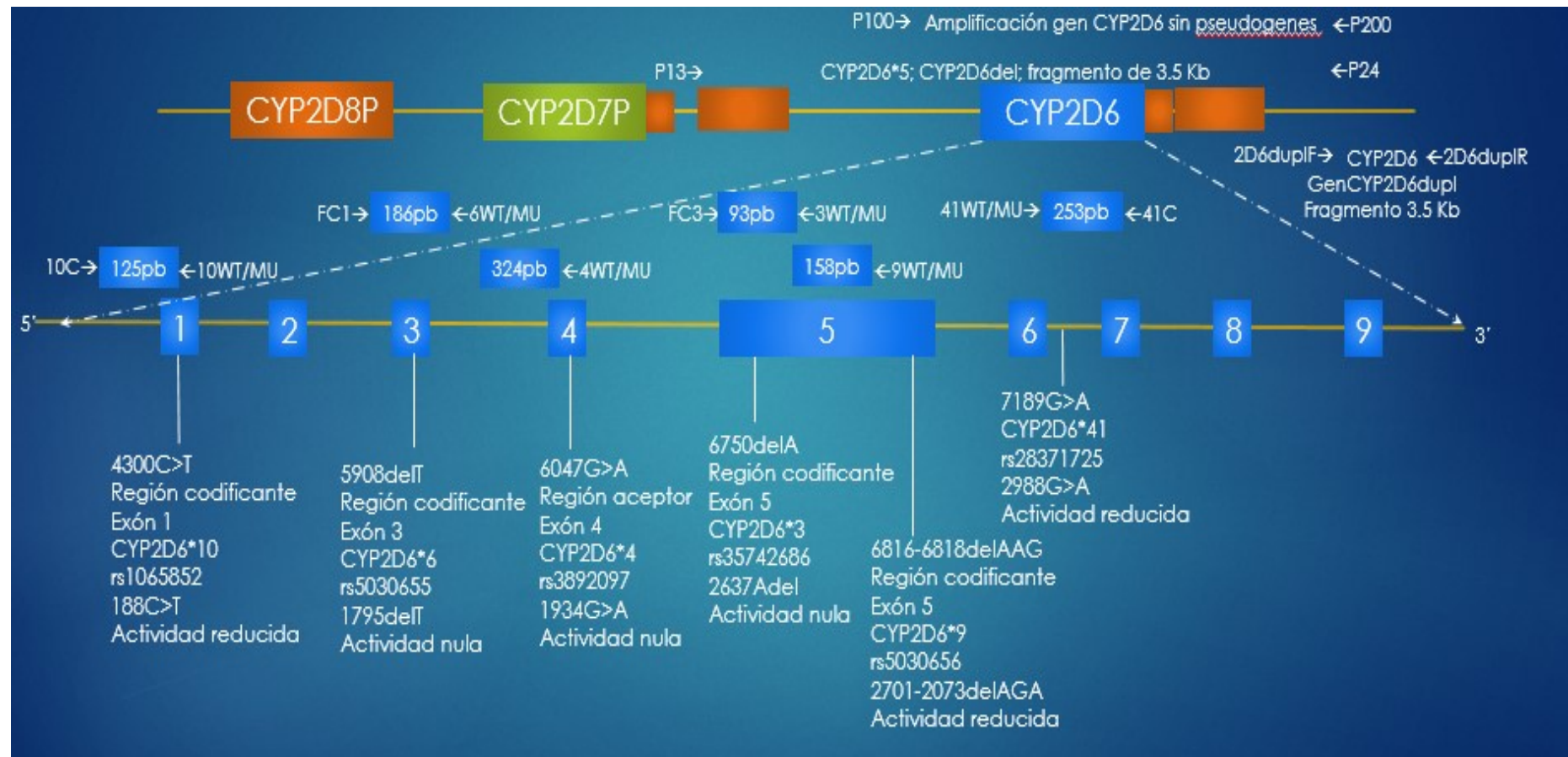


Figura 11. Localización de los polimorfismos rs1065852, rs5030655, rs3892097, rs35742686, rs5030656 y rs28371725 con respecto a sus intrones y exones del gen CYP2D6 (OMIM 124030) de coordenadas genómicas GRCh38: 22: 42,125,530-42,130, 880 (NCBI). Así como, posicionamiento de los primers utilizados en la PCR multiplex larga y PCR multiplex ARMS, para la amplificación del gen CYP2D6 y detección de los polimorfismos CYP2D6*3, *4, *5, *6, *9, *10 y *41, respectivamente. El diseño de los primers fue realizado en base a la secuencia nucleotídica actualizada AY545216.1 del proyecto genoma humano, que es coincidente con la publicada por Kimura y col. en 1989.

5.7 ELECTROFORESIS EN MINIGELES DE AGAROSA

La agarosa es una fracción extraída de algas productoras de agar que presenta una histéresis significativa, diferencia entre temperaturas de fusión y gelificación, que la hace idónea para técnicas de separación como la electroforesis. En concreto gelifica a temperaturas comprendidas entre 32-45°C y funde a temperaturas entre 80-95°C. En nuestro caso, se utilizó para la separación de fragmentos de ADN, que fueron amplificados en las PCRs multiplex con primers diseñados estratégicamente para obtener el gen CYP2D6 libre de pseudogenes CYP2D7 y CYP2D8, así como para identificar los polimorfismos CYP2D6.

En función de los tamaños de los fragmentos que se deseaban resolver, se varió el tamaño de poro del gel de agarosa ajustando la concentración. Ello permitió que los fragmentos de menor tamaño se movieran con mayor facilidad a través de los poros de la matriz de agarosa, mientras que los fragmentos grandes ejercieran una mayor resistencia durante su migración. En nuestro caso, seguimos las recomendaciones del fabricante de agarosas de la marca Conda para la resolución de los productos de ADN, amplificados en la PCR larga antes explicada.

Dado que los primers diseñados iban a generar fragmentos de 4,7 y 3,5Kb, se utilizó la agarosa D1 LE (Low Electroendosmosis) GQT (Genetic Quality Tested), específica para separar fragmentos de ADN superiores a 1000pb y con baja electroendosmosis a fin de evitar obtener una deriva de las bandas electroforéticas problema, lo que impediría una correcta interpretación con respecto a las bandas del ladder.

Cada tanda de productos de ADN era cargada en un gel de agarosa al 1,2% (p/v) en tampón TBE 1x (Tris-Borato-EDTA). El Tris era un tampón regulador del pH, el borato contribuyó al ajuste del pH y el EDTA era un quelante de cationes divalentes como el Mg^{2+} , cofactor de las endonucleasas, evitándose la degradación de los

ácidos nucleicos. Así mismo, el TBE permitió una compactación, y en consecuencia una definición de las bandas de ADN, mejor que el buffer TAE 1x.

Se pesaba 0.48g de agarosa D1 LE (Low Electroendosmosis) GQT (Genetic Quality Tested) de la empresa Conda en un vaso de precipitados de 100mL, y se disolvía en 40mL de tampón TBE 1x mediante un agitador magnético con calefactor. La mezcla se tapaba con papel de aluminio para evitar salpicaduras cuando se calentaba, y se retiraba del calor cuando había alcanzado la temperatura de fusión, momento que era identificado con la presencia de burbujas y una transparencia absoluta.

Se añadía un volumen de 2,5µL de Red Safe TM (20.000x) de la empresa iNtRON Biotechnology, n° catálogo 21141, una vez la temperatura había descendido a 60°C, colorante que se uniría posteriormente durante la migración de los fragmentos de ADN, permitiendo visualizar la fluorescencia de las bandas en el ultravioleta. La excitación del colorante se producía a una longitud de onda de 537nm.

Acto seguido, la solución de agarosa era decantada en la minicubeta de electroforesis, en la que se habían colocado previamente unos peines con 16 posiciones. Los peines eran retirados suavemente tras una completa gelificación a temperatura ambiente, dejando 16 agujeros para dispensar las muestras o productos de la PCR multiplex.

La cubeta de electroforesis era rellena con tampón TBE 1x hasta el límite indicado en la misma, a fin de permitir la conductividad y la absorción de calor. Un volumen de 5µL de producto PCR, equivalente al 20% del volumen de reacción de la PCR multiplex, era mezclado en un parafilm estéril con 1µL de tampón de carga concentrado con azul de bromofenol (Buffer 6x Loading) específicamente indicado para facilitar la visualización y sedimentación del producto de PCR en los agujeros del gel de electroforesis.

La mezcla era aspirada y depositada con una pipeta automática de 10µL en uno de los pocillos del gel. Un volumen de 1.5µL de ladder de ADN de la empresa Lonza Rockland, n° catálogo 50323, con 16 fragmentos en incrementos de 500pb y en un rango de 500pb a 8Kb, era mezclado con 1µL de buffer 6x loading y depositado en uno de los pocillos laterales a fin de identificar posteriormente el tamaño de cada una de las bandas problema.

La aplicación constante de una diferencia de potencial de 80V, permitió la migración de los fragmentos de ADN del producto de la PCR larga sin que se desintegrara el gel de agarosa por exceso de calor.

La resolución del método electroforético permitía evaluar la presencia e integridad del gen CYP2D6 amplificado en la PCR larga, al igual que la delección del polimorfismo CYP2D6*5 y las duplicaciones del gen CYP2D6. La ubicación de los primers P100 y P200 generaban una banda única de 4,7Kb que se asociaba con el gen CYP2D6. Los primers CYP13, CYP24, 2D6duplF y 2D6duplR generaban la amplificación de dos bandas, una de 4,7Kb y otra de 3,5Kb cuando el individuo era heterocigoto CYP2D6*1/*5 o CYP2D6*1/2x; situación que para diferenciarla obligaba a desarrollar dos PCR más en las mismas condiciones, pero cada una de ellas con la pareja de primers del polimorfismo en cuestión. La presencia de una banda única de 3,5Kb se asociaba con una delección homocigota CYP2D6*5.

Esta misma técnica electroforética era reproducida para estudiar las bandas generadas tras la amplificación de las PCRs ARMS 1 y 2, explicadas más adelante. Sólo que, al ser los fragmentos de ADN de menor tamaño, se disminuyó el poro del gel de agarosa aumentando su concentración.

Así pues, se realizó el mismo proceso, pero al 3% (p/v) de la agarosa D1 LE (Low Electroendosmosis) GQT (Genetic Quality Tested) en tampón TBE 1x (Tris-Borato-EDTA) y una diferencia de potencial de 100V.

Los productos de la PCR ARMS 1 generaron para el gen nativo CYP2D6*1 tres bandas de 324, 186 y 125 pb, al tiempo que para la ARMS 2 generó tres bandas de 253, 158 y 95 pb. Bandas que podrían ser complementadas con fragmentos específicos cuando los alelos polimórficos CYP2D6*3, *4, *6, *9, *10 y *41 estaban presentes en el individuo, los cuales eran de 95pb en el ARMS 1 (CYP2D6*3), 324 pb y 125pb en el ARMS 2 (CYP2D6*4), 186 pb en el ARMS 2 (CYP2D6*6), 158pb en el ARMS 1 (CYP2D6*9), 125pb en el ARMS 2 (CYP2D6*10) y 253pb en el ARMS 1 (CYP2D6*41).

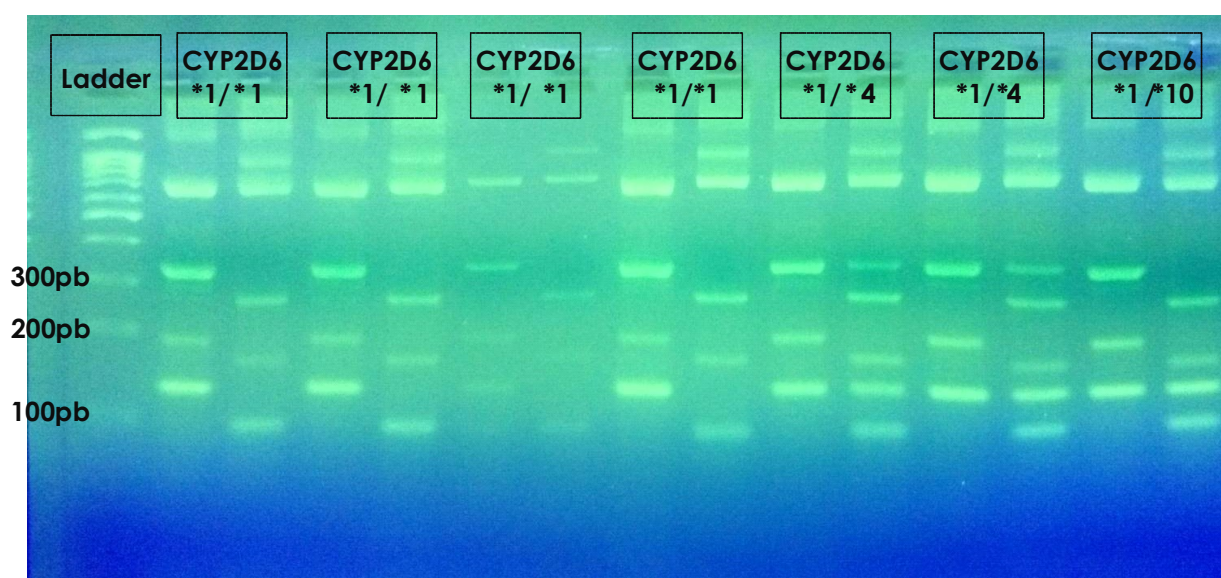


Figura 12. Ejemplo de electroforesis de agarosa PCR ARMS 1 y 2. En la columna primera de la izquierda se visualiza el Ladder, y a continuación, de izquierda a derecha y de forma alternada, se visualizan los productos resultantes de las PCR ARMS 1 y 2. Podemos identificar tres patrones: múltiples alelos CYP2D6*1 con bandas de 324, 186, 125pb en ARMS 1 y 253, 158 y 95pb en ARMS2; dos alelos CYP2D6*4 con bandas extra de 324pb y 125pb en ARMS 2; un alelo CYP2D6*10 con banda extra de 125pb en ARMS 2.

5.8 PCR ARMS (Amplification Refractory Mutation System) MULTIPLEX.

Para el genotipado de los polimorfismos CYP2D6*3, *4, *6, *9, *10 y *41, se puso a punto una metodología basada en la PCR ARMS descrita previamente por Roberts y col. ⁽⁴⁰⁾, y a la que se aplicaron algunas modificaciones. Esta técnica no requiere de enzimas de restricción, ni oligonucleótidos alelos específicos, ni la secuenciación nucleotídica de los productos de la PCR.

La base de este método se fundamenta en el hecho de que los primers con un nucleótido no coincidente con el ADN molde en posición 3'-terminal, no funcionarán como cebadores en la PCR en condiciones óptimas de amplificación⁽⁴¹⁾. En consecuencia, esta técnica de amplificación requiere que el nucleótido terminal en posición 3' del primer sea específico del alelo diana. Así, para detectar una Citosina mutada, el primer debe tener en su extremo 3' una Guanina para poder unirse, y si queremos detectar una Adenina se requiere de una Timina.

Requisitos de la técnica ARMS son, por un lado, la ausencia de una actividad 3'-exonucleolítica de corrección (exonucleasa) asociada con la Taq polimerasa ⁽⁴¹⁾. Por otro lado, los primers diseñados deben presentar desajustes refractarios en los terminales 3'-OH, a fin de ser resistentes a la extensión por la Taq polimerasa. Así, sabiendo que, según Little ⁽⁴³⁾, la fuerza de los emparejamientos terminales no coincidentes del tipo A/A, G/G, C/A y G/T, entre otros, no garantiza en su totalidad evitar la extensión de la Taq polimerasa, se agregó un desajuste intencionado en el segundo nucleótido del terminal 3' del primer, cambiándolo por la base existente en la secuencia complementaria. Ello incrementaba la discriminación y aseguraba que la amplificación sólo aconteciera en presencia del primer correcto, nativo o mutado ^(40, 42). Todos los primers alelo específicos tenían 30 pb para asegurar la especificidad.

Considerados estos requisitos, se solicitó a Sigma-Aldrich la fabricación de dos grupos de primers, uno para identificar el alelo mutante y otro para el nativo, todos ellos fundamentados según el punto de mutación de los alelos CYP2D6*3, *4, *6, *9, *10 y *41. Los primers sintetizados detectaban las mutaciones nucleotídicas 2637Adel en el Exon 5 (CYP2D6*3), 1934G>A en la región aceptor del Exon 4 (CYP2D6*4), 1795delT en el Exon 3 (CYP2D6*6), 2701-2703delAAG en la región codificante del

Exón 5 (CYP2D6*9), 188C>T en la región del Exon 1 (CYP2D6*10) y 2988G>A en el Exon 6 (CYP2D6*41), tal y como se detalla en la figura 10.

Dos PCRs, imagen una de otra, nombradas como ARMS 1 y 2, conteniendo una combinación diferente de primers del alelo salvaje y del mutado según se detalla en tabla 2, fueron realizadas en paralelo por cada producto CYP2D6 amplificado en la PCR larga, ya antes explicada.

Para una resolución más sencilla en geles de agarosa, se sintetizaron otros cuatro primers comunes a ambas PCR ARMS, los cuales se nombraron como FC1, FC3, 10C y 41C. Ello permitió obtener productos de PCR alelo específico entre 95pb y 325 pb, y tamaños diferenciados en 30pb.

Primer	Secuencia 5'-3'	Tubo ARMS
FC1	GAT GGT GGG GCT AAT GCC TTC ATG GCC ACG	1 y 2
4WT	CAA GAG GCC GTT GGG GCG AAA GGG GCG TgC	1
4MU	CAA GAG GCC GTT GGG GCG AAA GGG GCG TgT	2
6WT	ACA AAG GCA GGC GGC CTC CTC GGT CAC CgA	1
6MU	ACA AAG GCA GGC GGC CTC CTC GGT CAC CgC	2
FC3	GCA AGG TCC TAC GCT TCC AAA AGG CTT TCC	1 y 2
3WT	GGG GGG CT G GGC TGG GTC CCA GGT CAT CgT	2
3MU	GGG GGG CT G GGC TGG GTC CCA GGT CAT CgG	1
9WT	GCC CCC CAC CGT GGC AGC CAC TCT CAC CaT	2
9MU	GCC CCC CAC CGT GGC AGC CAC TCT CAC CaC	1
10C	GGC TAG AAG CAC TGG TGC CCC TGG CCG TGA	1 y 2
10WT	CAG CCC GGG CAG TGG CAG GGG GCC TGG TcG	1
10MU	CAG CCC GGG CAG TGG CAG GGG GCC TGG TcA	2
41C	ATC TCT GGT CGC CGC ACC TGC CCT ATC ACG	1 y 2
41WT	TCT GGG AAA CAG TGC AGG GGC CGA GGG AcG	2
41MU	TCT GGG AAA CAG TGC AGG GGC CGA GGG AcA	1

Tabla 3. Primers ⁽⁴⁰⁾ de las PCRs ARMs 1 y 2. El desajuste intencionado se muestra en letra pequeña en la penúltima posición del terminal 3'. Los primers comunes FC1, FC3, 10C y 41C no requerían modificación.

Las dos PCR ARMS se realizaron en un volumen de reacción final de 25µL. Dos tubos de reacción específicos para un termociclador Applied Biosystems AB9700, se

rotulaban identificándolos como ARMS 1 y ARMS 2. Dos Máster Mix, diferenciadas como ARMS 1 o 2, eran preparadas justo antes de la PCR, considerando el número total de reacciones a realizar.

Para cada reacción de PCR ARMS, se añadía 0,5µL de una Mix dNTPs 10mM (Invitrogen ThermoFisher Scientific, n° catálogo 10297-018); 1,5µL de una solución 50mM de MgCl₂; 2,5µL de tampón de reacción concentrado 10x libre de MgCl₂; 1µL de la polimerasa con una concentración de 1U/µL (todo ello suministrado en el kit de la enzima "DNA Biotools Pymerase, n° catálogo 10002"); 17,5µL de H₂O destilada libre de nucleasas y 1µL de una mix de primers ARMS 1 o ARMS 2, previamente preparada. La concentración final de los primers 3WT/MU y 4WT/MU era de 0,4µM, y de 0,2µM para el resto de primers. Un volumen de 24µL de esta Máster Mix era depositada en cada uno de los tubos de reacción PCR ARMS 1 ó 2, según procediese, a la cual se añadía 1µL de producto de reacción de la PCR larga.

La solución stock de primers ARMS 1 y 2 se preparaba en volúmenes de 100µL. Para ello, según tabla 2, se pipeteaba 10µL de cada uno de los primers 3WT/MU y 4WT/MU, y 5µL de cada uno del resto de primers, todos ellos a partir de una concentración stock 100µM. Mezcla a la que se añadía 40µL de tampón Tris-EDTA, y se almacenaba a -20°C.

Las condiciones programadas en el termociclador Applied Biosystems AB9700 para ambas PCR ARMS fueron 94°C durante 2 min, seguido de 14 ciclos de 94°C durante 30s, un anillamiento a 68°C durante 30s, y una extensión a 72°C durante 1 min. Por último, se programó una extensión final de 72°C durante 10min, dejándose a 4°C hasta ser analizadas. El producto de la reacción de PCR fue resuelto en gel de agarosa al 3% con un ladder con masas en el rango de los fragmentos a analizar de la empresa Biotools. Procedimiento explicado anteriormente.

La incorporación de nuevas tecnologías en el laboratorio clínico como el autoanalizador LightCycler® 480 II (figura 14), que utiliza kits comerciales LightMix® Kit para la detección de los alelos polimórficos *3, *4 y *5 (nº cat 40-0305-32, ref. 06296742001), nos sugirió realizar una selección de muestras identificadas mediante la metodología PCR ARMS con los mismos polimorfismos, y procesarlas de nuevo en este termociclador con el bloque de tiempo real incorporado (PCR tiempo real). La amplificación y detección de fragmentos diana de ADN mediante la adición de sondas específicas marcadas con fluorescencia proporcionaron resultados idénticos. Resaltar su rapidez, aunque presenta una cartera de polimorfismos reducido en un mismo proceso analítico.

Figura 13. Magna Pure Compact. Equipo comercializado por la empresa Roche para la autoextracción de ADN genómico.

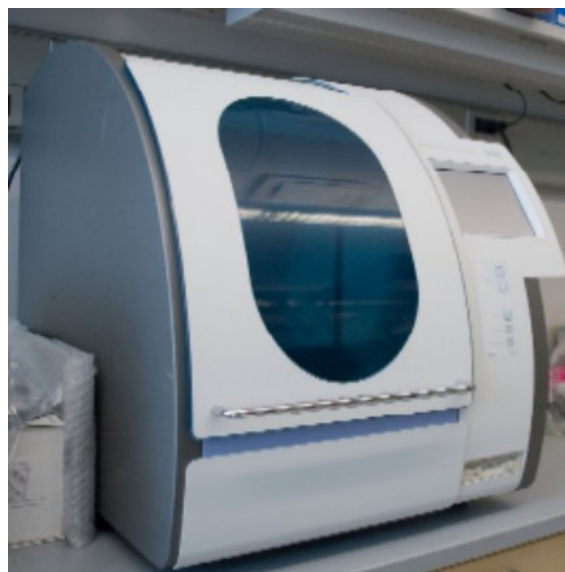


Figura 14. Autoanalizador LightCycler® 480-II de Roche con termociclador PCR Real Time (PCR RT) incorporado. Dispone de la metodología Melting Curve Genotyping; curvas de fusión que permiten diferenciar diplotipos homocigotos y heterocigotos.



5.9 HPLC-MS/MS EN FASE REVERSA CON GRADIENTE ELUCIÓN

La cromatografía líquida acoplada a un detector de masas en tandem (HPLC-MS/MS) es un método analítico ampliamente aceptado como técnica de referencia en el bioanálisis cuantitativo ^(182, 183), incluso en un entorno de laboratorio clínico ⁽⁶³⁾, ya que ofrece un tiempo de respuesta más corto que otros ampliamente contrastados.

Principalmente, ello se debe a su selectividad, sensibilidad, y detección de alto rendimiento. Sin embargo, estas características dependerán de la técnica de ionización, de la selectividad inherente al espectro de masas, de la sensibilidad y velocidad, así como de la disponibilidad de isótopos estables marcados (SIL: stable isotope labeled) y la resolución cromatográfica adecuada de múltiples analitos endógenos en un mínimo marco de tiempo.

En nuestro caso, pusimos a punto el método de Madlensky y col. ⁽⁶³⁾. Se utilizó un equipo de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) para separar el tamoxifeno y sus metabolitos por cromatografía en fase reversa (RPLC) con gradiente de elución. Este método detectó tamoxifeno ($m/z_{372/72}$), N-desmetil-tamoxifeno ($m/z_{358/58}$), endoxifeno ($m/z_{374/58}$), 4-hidroxi-tamoxifeno ($m/z_{387/105}$), así como los estándares internos deuterados D5-tamoxifeno ($m/z_{377/72}$), D5-N-desmetil-tamoxifeno ($m/z_{363/58}$) y D5-endoxifeno ($m/z_{379/58}$).

Además, este gradiente de elución separaba endoxifeno y 4-hidroxi-endoxifeno de los correspondientes isómeros 4'-endoxifeno y 4'-hidroxi-endoxifeno. Los picos de HPLC eran detectados por espectrómetro de masas con trampa de iones en tándem. La imprecisión (CV) era aproximadamente inferior al 7% para el tamoxifeno y sus metabolitos. Era lineal hasta 250ng/mL para tamoxifeno y endoxifeno, y hasta 500ng/mL para N-desmetil-tamoxifeno.

Además, presentaba una buena correlación interlaboratorios. Así pues, parece que el método HPLC-MS/MS reunía las características apropiadas como para desarrollar parte del objetivo metodológico de nuestra tesis doctoral.

5.9.1 REACTIVOS

Se utilizaron estándares de tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno, N-desmetil-tamoxifeno, endoxifeno, y estándares internos deuterados de tamoxifeno-D5, 4-hidroxi-tamoxifeno-D5, N-desmetil-tamoxifeno-D5, endoxifeno-D5, adquiridos a Toronto Research Chemicals.

El metanol, acetonitrilo (ACN) y agua calidad LC-MS, se obtuvieron de LAB-SCAN; el ácido fórmico de FLuka Analytical.

También se utilizaron muestras de suero humano fresco carentes de fármaco para la validación.

5.9.2 INSTRUMENTACIÓN

Para la separación cromatográfica se utilizó un sistema HPLC de Agilent 1200 series (figura 15), equipado con un degasificador G1379B, una bomba binaria G1312A de 600 bares, un inyector automático H-ALS G1367B y un horno para columnas G1316A. Se utilizó una columna C18 (150mm x 2.1mm I.D., 3.5µm) de Agilent, con una temperatura de 30°C. Se utilizaron

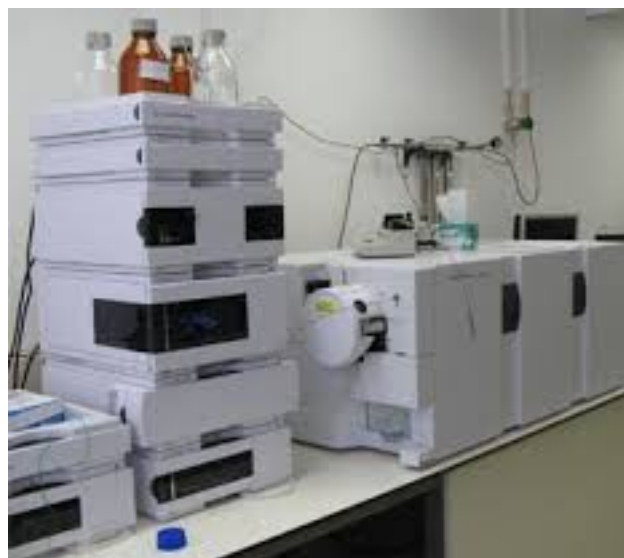


Figura 15. HPLC Agilent 1200 series y detector de masas triple cuadrupolo Agilent 6410.

iones moleculares de $M+H$ (ionización positiva), y se optimizaron estos como subproductos para fabricar un método MRM con la suficiente sensibilidad y selectividad.

La fase móvil utilizada fue una solución de agua al 0.1% de Ácido Fórmico (Fase Móvil A), y ACN al 0.1% de Ácido Fórmico (Fase móvil B). Se pasaron las fases móviles A y B a través de una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 (150 mm x 2.1 mm I.D., 3.5 μ m) de Agilent (U.S.A.).

La separación se efectuó a una temperatura mantenida de 30°C en columna. Fueron realizados una inyección automática de 10 μ L con una solución de ACN/Agua, y lavados posteriores de la aguja durante 14 segundos. La duración del método fue de 20 minutos, con un post-time de 6.5 minutos para equilibrado de columna.

Para la detección se utilizó un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (6410 Triple Quad LC/MS), de Agilent Technologies U.S.A., equipado con una fuente de ionización E.S.I. funcionando en modo positivo. Para monitorizar los iones se optimizó una reacción múltiple de cuantificación (MRM) con la ayuda del software Mass Hunter de Agilent Technologies.

5.9.3 CALIBRACIÓN, CONTROLES, ESTÁNDARES INTERNOS Y MUESTRAS

Se prepararon soluciones stock para estándares de calibración, estándares internos y controles de calidad. Los estándares de calibración se prepararon partiendo de "soluciones madre" con concentración igual a 1mg/ml para cada uno de los compuestos. A partir de éstos, se preparó una "solución mezcla" de trabajo en metanol y una concentración final de 10.000ng/mL para cada una de las moléculas tamoxifeno, N-desmetil-tamoxifeno y endoxifeno; y de 5.000ng/mL para el 4-hidroxi-tamoxifeno. En cuanto a los estándares internos preparados a partir

de compuestos deuterados, se procedió a preparar una mezcla de solución stock deuterada (1:1:1:1) de tamoxifeno-D5, 4-hidroxi-tamoxifeno-D5, N-desmetil-tamoxifeno-D5 y endoxifeno-D5 diluidos en ACN.

Los controles se prepararon a partir de una solución stock con concentración igual a 1mg/ml para cada uno de ellos.

Tanto los calibradores como los controles fueron procesados como si de una muestra se tratase. Así pues, se procedió en todos ellos como se indica a continuación. A un volumen de 100µL de calibrador, control y suero, se le añadió 284µL de ACN al 1% de fórmico y 16µL de la solución stock deuterada. Se vorteoó durante 20sg y se centrifugó 5 minutos a 15.000rpm. Se traspasó el sobrenadante a una columna HybridSPE (Supelco), y el eluído se encapsuló en microviales, pudiendo conservar entre 2-8°C hasta su procesamiento.

Las curvas de calibración se ajustaron mediante regresión lineal de mínimos cuadrados. Los coeficientes de correlación (r^2) fueron en todos los casos mayores de 0.99. Se estimaron sólo los límites de detección y de linealidad; no se han estudiado los límites superiores.

	LLQ	Linealidad curva calibración
Tamoxifeno	0,38	3.9 -250 ng/ml
N-desmetil-tamoxifeno	0.35	3.9 -500 ng/ml
4-OH-tamoxifeno	0,35	1.05-250 ng/ml
Endoxifeno	0,48	2.5-250 ng/ml

Antes de pasar las muestras se analizaron 3 réplicas de cada uno de los controles de calidad, con niveles de concentración bajo, medio y alto. La exactitud debía situarse entre un $\pm 15\%$ de la concentración calculada, en caso contrario se volvía a calibrar.

El arrastre fue determinado mediante la cuantificación de tamoxifeno y sus metabolitos en una muestra sérica humana control negativo (blanco), inyectada justo después de procesar el calibrador de máxima concentración. Las áreas del blanco debían situarse en el 20% del área del nivel LLQ.

En ningún compuesto estudiado se detectó supresión iónica, por lo que puede deducirse que ésta fue del 100%.

5.9.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el software SPSS v.20 (IBM, Chicago, IL, USA) para los análisis estadísticos. El primer paso en el análisis de los datos, una vez introducidos los mismos, fue realizar un análisis descriptivo y representación gráfica de las variables polimorfismo genético CYP2D6 y concentraciones de tamoxifeno y sus metabolitos. Este análisis nos permitió controlar la presencia de posibles errores en la introducción de los datos, y nos dio una idea de la distribución y dispersión de cada uno de los mismos.

Para la asunción referida a la Normalidad de las poblaciones que se compararon, se utilizó la denominada prueba de Kolmogorov-Smirnov o Test K-S de una muestra. Según los resultados obtenidos, se realizó una transformación logarítmica de las concentraciones a fin de transformar la distribución en Normal y poder aplicar la prueba paramétrica T de una muestra, así como el test ANOVA de un factor.

Para la comparación de las variables cuantitativas para más de dos grupos, como aconteció para los grupos polimórficos CYP2D6, se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

ANEXO I. HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

DONACIÓN DE MUESTRAS SOBRANTES DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA ESTUDIO FARMACOGENÉTICO EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA.

Promotor: Cátedra UCM-Centro de Patología de la Mama Fundación Tejerina

Estimada paciente,

Nos dirigimos a usted para informarle que su Centro de Patología de la Mama Fundación Tejerina, en colaboración con la Facultad de Medicina Aula AINTEC (Análisis Investigación Tecnológica) de la Universidad Complutense de Madrid, está desarrollando un estudio de investigación biomédica al que se le invita a participar. Nuestra intención es que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar si quiere o no participar. Para ello lea esta hoja informativa con atención y pregunte cualquier duda que le pueda surgir. Su participación en el estudio es voluntaria y puede negarse a participar antes o durante el estudio sin que ello se derive ningún perjuicio en su tratamiento.

El estudio al que se le invita a participar no requiere ningún tipo de intervención diagnóstica ni terapéutica fuera de la práctica clínica habitual. Sólo requiere de su consentimiento para donar el resto de muestra de sangre extraída en sus controles analíticos. Su muestra será utilizada para conocer las anomalías genéticas a nivel del citocromo P450 (CYP450) asociadas a una baja metabolización de algunos medicamentos, como el tamoxifeno, fármaco ampliamente indicado a nivel mundial en el tratamiento de cáncer de mama estrógeno dependiente.

El diseño longitudinal del estudio contempla una primera visita cuando la paciente lleve un mínimo de cuatro meses en tratamiento contra el cáncer de mama, que coincidirá con su inclusión en el estudio, así como otras dos posteriores con una periodicidad trimestral. Estas visitas serán las que usted realiza de forma habitual para el seguimiento de su enfermedad y en las que se le realizará una extracción de sangre para su control analítico. Los análisis genéticos realizados, así como la cuantificación de los niveles de medicamentos, metabolitos y otros biomarcadores emergentes, servirán para estudiar su metabolismo farmacogenético.

Las muestras biológicas tomadas para estudiar su caso pueden ser conservadas y utilizadas posteriormente para realizar investigaciones biomédicas relacionadas con la enfermedad que usted padece. No se usarán directamente para fines comerciales. Las muestras se destruirán una vez dejen de ser útiles para documentar su caso, según las normas del centro.

En una primera fase, se estima que en este estudio participen 100 pacientes pre y post-menopáusicas caucásicas, con edades comprendidas entre los 15 y más de 75 años. La duración del estudio será de 6 meses, una vez se hayan incluido el paciente en el estudio.

Si usted decide participar se le pedirá que firme un formulario de consentimiento informado. Si decide no participar o abandonar el estudio, no tendrá que explicar los motivos que le han llevado a tomar esta decisión, y se le seguirá ofreciendo la misma calidad asistencial. El médico que le trata conservará un formulario de consentimiento informado original firmado y fechado por ambas partes. Usted recibirá un segundo ejemplar.

Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que a continuación se exponen. Durante el estudio atenderá a dos visitas trimestrales que coincidirán con las que realiza para el seguimiento de su enfermedad. En dicha visita su médico registrará determinada información de su historia clínica acerca de su enfermedad y tratamiento, y solicitará un control analítico en sangre. Al margen de esto, no tendrá que realizar ningún tipo de prueba especial.

Los beneficios serán, en todo caso, los que se deriven de los resultados del propio estudio en caso de que la información obtenida repercuta positivamente en el manejo de su enfermedad.

Tampoco tendrá un riesgo adicional diferente al que por sí tiene de su enfermedad y de la obtención de la muestra de sangre, que le serán indicados por su médico.

Toda la información que se obtenga durante el estudio será confidencial y ni usted ni sus datos, en ningún caso, estarán identificados en cualquier informe que se emita en este estudio. Estos datos se manejarán de acuerdo con la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/1999, de 13 de diciembre, teniendo usted los derechos que la citada ley le reconoce de acceso, rectificación, cancelación y oposición de los datos.

Si decide participar en el estudio, sus datos serán accesibles al promotor, para la verificación de los procedimientos y datos obtenidos durante el estudio, sin violar su confidencialidad. Los datos del estudio podrán ser publicados en revistas científicas pero su identidad será anónima. En todo caso, se cumplirá con la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/1999, de 13 de diciembre. Por último, decirle que su médico está a su disposición para atender cualquier consulta que quiera realizar en relación con el estudio.

ANEXO II. CONSENTIMIENTO INFORMADO

DONACIÓN DE MUESTRAS SOBRANTES DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA ESTUDIO FARMACOGENÉTICO EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA.

Promotor: Cátedra UCM-Centro de Patología de la Mama Fundación Tejerina

Conforme recoge la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica, se solicita su autorización escrita o la de su representante legal para la donación gratuita del sobrante de su/s muestra/s biológicas obtenidas para el diagnóstico de su enfermedad, con el fin de utilizarlo en este estudio farmacogenético y en futuros proyectos de investigación biomédica que cumplan con las exigencias éticas y legales aplicables.

DATOS DEL PACIENTE

Yo, (nombre del paciente) Dña.declaro que he leído la hoja de información al paciente, y he comprendido el propósito del estudio y los procedimientos que se realizarán durante el mismo. Comprendo que mi participación es voluntaria, que no conlleva ningún perjuicio para mi salud y que puedo retirarme del estudio cuando quiera. Por tanto, declaro estar correctamente informada según dispone la Ley 14/2007, de 3 de julio, y otorgo libremente mi consentimiento para participar en este estudio y ceder la/s muestra/s sobrante/s del proceso asistencial para que se me realice una extracción de ADN con el propósito que se me ha explicado, así como para su almacenamiento y conservación de forma anonimizada para posibles investigaciones biomédicas futuras relacionadas con otras mutaciones relevantes en su enfermedad.

Paciente	Médico
D.N.I.	D.N.I.:
Fdo.	Fdo.

En, a de de 201_.

DATOS del REPRESENTANTE LEGAL (sólo si fuese necesario)

Yo, (nombre del representante legal) D/Dña.en calidad de testigo independiente del equipo investigador declaro que he leído la hoja de información, y he comprendido el propósito del estudio y los procedimientos que se realizarán durante el mismo. Comprendo que la participación es voluntaria, que no conlleva ningún perjuicio para su salud y que puede retirarse del estudio cuando quiera. Así mismo, comprendo que la paciente recibirá una copia de este documento cuando esté firmado. En mi presencia se ha dado a mi representada toda la información pertinente adaptada a su nivel de entendimiento, está de acuerdo en participar y presto mi conformidad con que mi representada participe en este estudio. Por tanto, declaro estar correctamente informada/o según dispone la Ley 14/2007, de 3 de julio, y otorgo libremente mi consentimiento para su participación en este estudio y ceda la/s muestra/s sobrante/s del proceso asistencial para que se le realice una extracción de ADN con el propósito que se me ha explicado, así como para su almacenamiento y conservación para posibles investigaciones biomédicas futuras relacionadas con otras mutaciones relevantes en su enfermedad.

Paciente	Médico
D.N.I.	D.N.I.:
Fdo.	Fdo.

En, a de de 201_.

ANEXO III. HOJA RECOGIDA DE DATOS

ANAMNESIS:

FASE CLIMATERIO O MENOPAUSIA

<input type="checkbox"/> NO	<input type="checkbox"/> Premenopausia	<input type="checkbox"/> Menopausia	<input type="checkbox"/> Postmenopausia temprana ⁽¹⁾	<input type="checkbox"/> Postmenopausia tardía ⁽²⁾
-----------------------------	--	-------------------------------------	---	---

(1) Hasta cuatro primeros años; (2) Cinco años en adelante

SÍNTOMAS

☐ SOFOCOS AUSENTES ☐ SOFOCOS LEVES ☐ SOFOCOS MODERADOS ☐ SOFOCOS SEVEROS

TRATAMIENTO CON TAMOXIFENO

NOMBRE COMERCIAL MEDICAMENTO	DOSIS	FRECUENCIA	INICIO

OTROS MEDICAMENTOS

NOMBRE COMERCIAL	DOSIS	FRECUENCIA	INICIO

FECHA INCLUSIÓN EN EL ESTUDIO FARMACOGENÉTICO:

EDAD PACIENTE:

FECHA OBTENCIÓN DE LA MUESTRA:

SOLICITUD ANALÍTICA (Seleccionar con un aspa la opción que proceda realizarse):

<input type="checkbox"/>	Muestra sangre basal día inclusión en estudio ⁽³⁾	Análisis fármacos por LC/MS/MS y CYP2D6
<input type="checkbox"/>	Muestra sangre primer cuatrimestre ⁽³⁾	Análisis fármacos por LC/MS/MS
<input type="checkbox"/>	Muestra sangre segundo cuatrimestre ⁽³⁾	Análisis fármacos por LC/MS/MS

(3) Se extraerá sangre en dos tubos, uno con EDTA y otro sin anticoagulante.

6. RESULTADOS

Un total de 423 muestras de sangre anonimizadas de mujeres de la Comunidad Autónoma de Madrid fueron seleccionadas y clasificadas por edades como población de referencia, según criterios de inclusión, para el estudio posterior de las frecuencias poblacionales de los polimorfismos CYP2D6 con baja actividad metabólica, tal y como se muestra más abajo en el resumen del procesamiento de los casos y en el anexo IV. Todas ellas han sido consideradas como válidas al cumplir los criterios de inclusión en el estudio.

Resumen del procesamiento de los casos						
	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Edad años	423	100,0%	0	0,0%	423	100,0%

La frecuencia y distribución de edades del 100% de las muestras obtenidas, presentan una distribución normal según prueba de Kolmogorov-Smirnov ($p > 0.05$). La baja curtosis obtenida, ver tabla descriptivos, verifica que la selección de muestras con edades distantes con respecto a la media de la distribución (45 años), presentan una frecuencia muy similar. Por lo que podemos concluir, que es una representación muestral continua homogénea como se puede visualizar en el histograma de edades (figura 14).

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra		
		Edad años
N		423
Parámetros normales (a, b)	Media	45,25
	Desviación típica	18,117
Diferencias más extremas	Absoluta	,070
	Positiva	,070
	Negativa	-,064
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,430
Sig. asintót. (bilateral)		,034

(a) La distribución de contraste es la Normal.

(b) Se han calculado a partir de los datos.

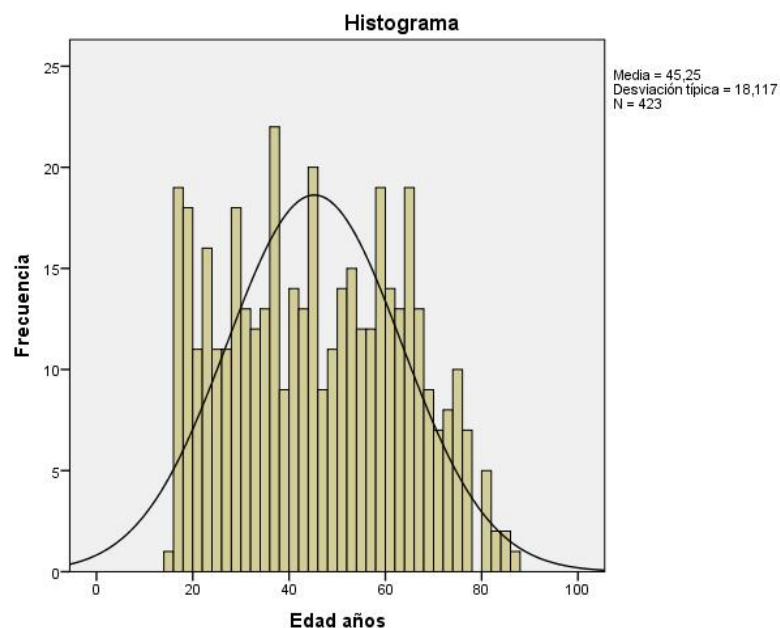


Figura 14. Histograma de frecuencias de edades del grupo de mujeres de referencia de la Comunidad Autónoma de Madrid.

En base a los cálculos de percentiles, podemos afirmar que el promedio ponderado de mujeres con edades inferiores a 45 años es del cincuenta por ciento, y según se desprende de las bisagras de Turque, el 50% de nuestra población de referencia tiene una edad comprendida entre los 30 y 60 años. Todo ello indica que se cubre un amplio rango de mujeres pre y postmenopáusicas. No olvidemos que, tal y como se ha explicado en la introducción, la FDA aprueba el uso del tamoxifeno para la reducción del riesgo de cáncer de mama en mujeres pre- y postmenopáusicas, siendo muy necesario que la población de referencia seleccionada cubra ampliamente este rango de edades para poder estudiar correctamente la frecuencia poblacional para los polimorfismos del gen CYP2D6.

Percentiles								
		5	10	25	50	75	90	95
Promedio ponderado	Edad años	18,00	20,00	30,00	45,00	60,00	69,60	74,00
Bisagras de Tukey	Edad años			30,00	45,00	60,00		

Así mismo, la medida de centralización como es la mediana, valor que divide a la distribución de los datos en dos partes iguales, es de 45 años, con un mínimo de 15 años y un máximo de 87 años, lo que cubre un amplio rango de mujeres, incluyendo aquellas de mayor edad polimedicadas. Edades extremas que se asocian con una mínima asimetría positiva, y representan sólo un porcentaje acumulado del 1,4% y del 1,1%, respectivamente, sin importancia estadística alguna.

Descriptivos				
			Estadístico	Error típ.
Edad años	Media		45,25	,881
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	43,52	
		Límite superior	46,98	
	Media recortada al 5%		44,97	
	Mediana		45,00	
	Varianza		328,211	
	Desv. típ.		18,117	
	Mínimo		15	
	Máximo		87	
	Rango		72	
	Amplitud intercuartil		30	
	Asimetría		,114	,119
	Curtosis		-1,049	,237

Valores extremos				
			Número muestra	Valor
Edad años	Mayores	1	358	87
		2	394	85
		3	417	84
		4	298	82
		5	400	82
	Menores	1	308	15
		2	421	16
		3	331	16
		4	329	16
		5	153	16 (a)

(a) En la tabla de valores extremos menores sólo se muestra una lista parcial de los casos con el valor 16.

En cuanto al procesamiento de los casos genéticos, se realizó una estadística descriptiva de los genotipos CYP2D6 obtenidos a partir del ADN genómico de 423 mujeres anonimizadas de la Comunidad de Madrid, lo que representa el 100% de

nuestra población de referencia (ver Anexo IV); ello ha significado analizar e interpretar un total de 6.768 reacciones de PCR para poder identificar los alelos de actividad metabólica reducida. Se eligió el procedimiento de frecuencias, ya que el grupo genético CYP2D6 es una variable cualitativa. Las tablas de frecuencias genotípicas, con las frecuencias absolutas y los porcentajes, se detallan a continuación.

Estadísticos		
Genotipo CYP2D6		
N	Válidos	423
	Perdidos	0

Genotipo CYP2D6					
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	2D6 1-1	249	58,9	58,9	58,9
	2D6 1-10	12	2,8	2,8	61,7
	2D6 1-3	5	1,2	1,2	62,9
	2D6 1-4	103	24,3	24,3	87,2
	2D6 1-41	19	4,5	4,5	91,7
	2D6 1-5	2	,5	,5	92,2
	2D6 1-6	1	,2	,2	92,4
	2D6 1-9	19	4,5	4,5	96,9
	2D6 3-10	1	,2	,2	97,2
	2D6 3-4	1	,2	,2	97,4
	2D6 4-41	2	,5	,5	97,9
	2D6 4-9	8	1,9	1,9	99,8
	2D6 6-41	1	,2	,2	100,0
	Total	423	100,0	100,0	

Una representación gráfica en forma de histograma se representa a continuación a fin de visualizar la distribución de los diferentes polimorfismos genéticos encontrados (figura 17). Se aprecia un total de 13 genotipos CYP2D6 en la población de referencia, siendo el gen nativo CYP2D6*1 mayoritario, seguido de los genotipos con al menos un alelo polimórfico de baja actividad metabólica CYP2D6*4, *9, *41, *10 y *3, con porcentajes del 24.3%, 4.5%, 4.5%, 2.8% y 1.2%,

respectivamente. Los alelos *5 y *6 son minoritarios, con 0,5% y 0,2%, respectivamente.

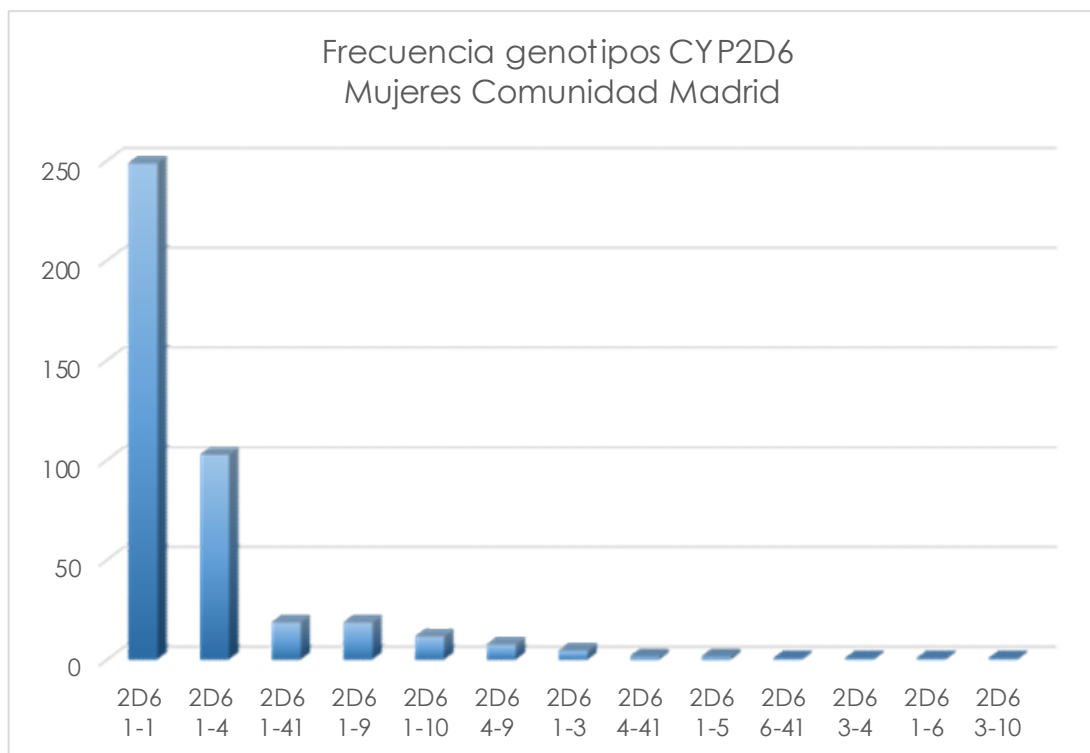


Figura 17. Histograma frecuencia genotipos en población de referencia de la Comunidad de Madrid.

A fin de analizar estadísticamente si los polimorfismos CYP2D6 encontrados eran dependientes de la edad, a mayor edad más probabilidad de mutar, se realizó un análisis de la varianza ANOVA de un factor para comparar las medias de más de dos grupos (anexo IV). Ello fue realizado en un software IBM SPSS® Statistics Version 20. La elección de este estadístico fue porque uno de los grupos de estudio era la edad en años, dependiente, con resultado cuantitativo, y los otros independientes con resultados cualitativos agrupados según el tipo de polimorfismo CYP2D6 analizado; además de que no todos los grupos eran del mismo tamaño.

Descriptivos edad años								
Genotipo	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
2D6 1-1	249	45,76	18,155	1,151	43,49	48,02	15	85
2D6 1-10	12	56,67	20,313	5,864	43,76	69,57	17	82
2D6 1-3	5	40,60	19,204	8,588	16,75	64,45	21	66
2D6 1-4	103	45,17	18,383	1,811	41,57	48,76	16	87
2D6 1-41	19	38,37	17,967	4,122	29,71	47,03	16	73
2D6 1-6	1	65,00	65	65
2D6 1-9	19	41,74	14,843	3,405	34,58	48,89	17	68
2D6 3-10	1	70,00	70	70
2D6 3-4	1	50,00	50	50
2D6 4-41	2	31,00	19,799	14,000	-146,89	208,89	17	45
2D6 4-9	8	41,00	13,438	4,751	29,77	52,23	19	57
2D6 1-5	2	43,00	11,314	8,000	-58,65	144,65	35	51
2D6 6-41	1	29,00	29	29
Total	423	45,25	18,117	,881	43,52	46,98	15	87

Esta tabla de descriptivos nos muestra la edad media en la que aparecen los diferentes genotipos; y la prueba de Levene, contrasta la homogeneidad de varianzas que, al ser $p > 0.05$, no podemos rechazar la igualdad de varianzas, asumiendo que las varianzas son homogéneas.

Prueba de homogeneidad de varianzas			
Edad años			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
,844 ^a	8	410	,565

a. Los grupos con un único caso se ignoraron al calcular la prueba de homogeneidad de la varianza para Edad años.

ANOVA de un factor					
Edad años					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	4720,714	12	393,393	1,206	,276
Intra-grupos	133784,222	410	326,303		
Total	138504,936	422			

La tabla ANOVA de un factor nos presenta la significación estadística, que al ser $p > 0,05$, no podemos rechazar la hipótesis nula de igualdad de medias. Todos los grupos son iguales en medias al resto. La edad no incrementa el número de polimorfismos CYP2D6.

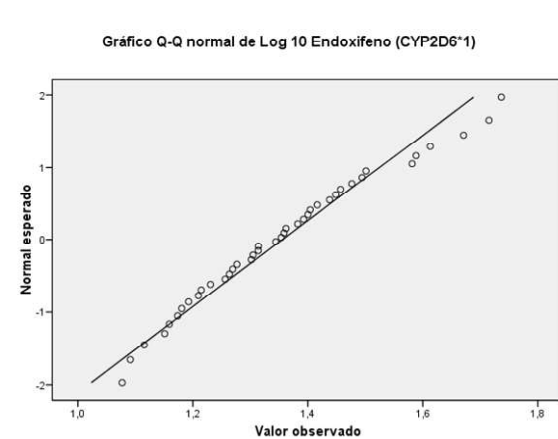
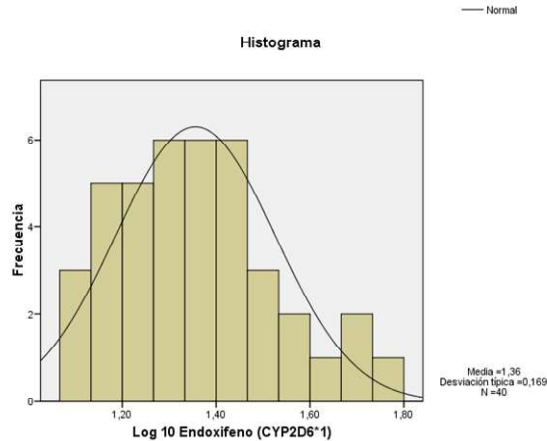
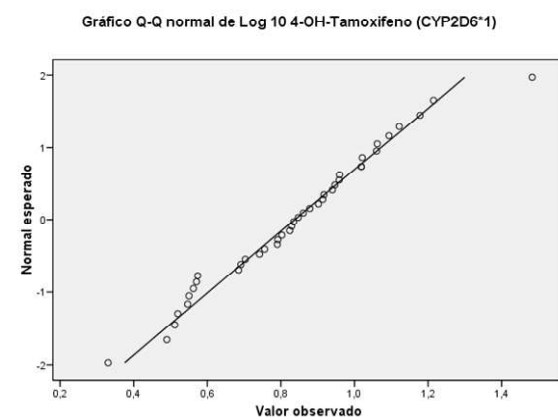
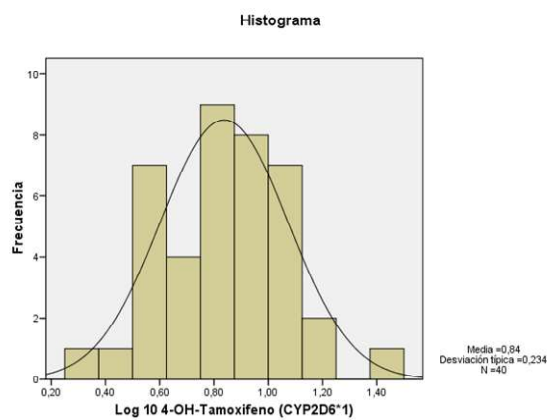
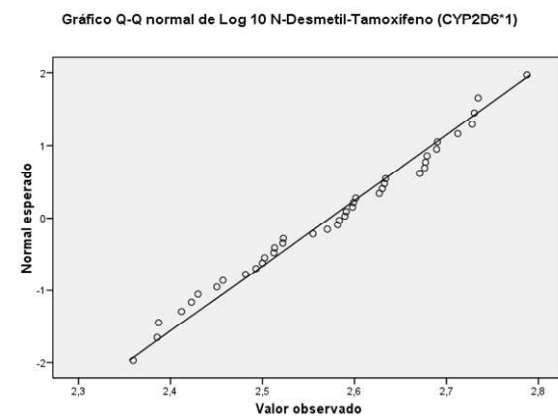
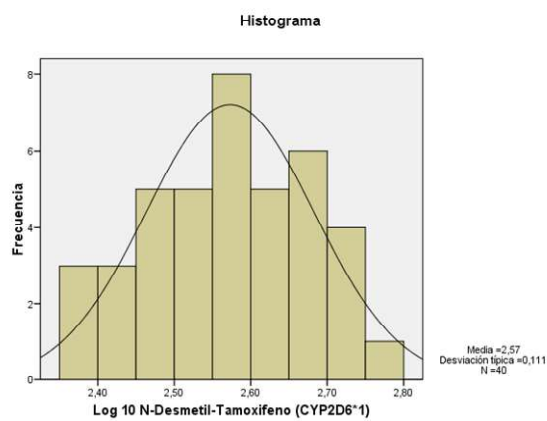
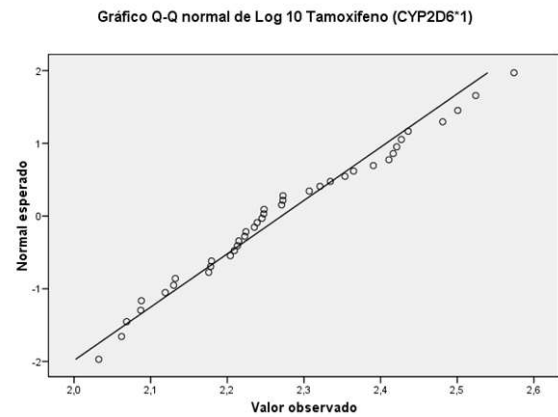
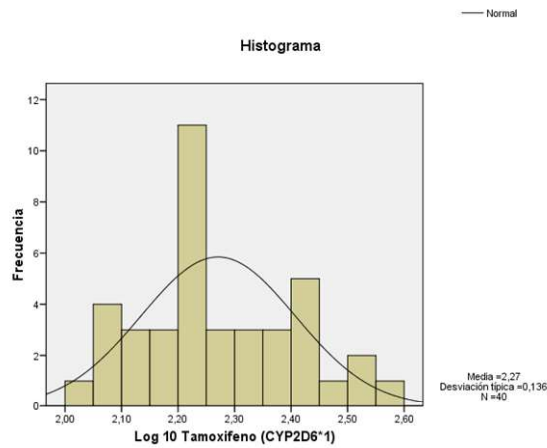
Así mismo, se agruparon los polimorfismos CYP2D6 en grupos de edad seriados en 5 años. Dicha agrupación se detalla en anexo V. A partir de esta agrupación se calcularon los porcentajes de cada genotipo, y se diferenciaron los porcentajes de genotipos con un alelo polimórfico de aquellos otros con dos alelos polimórficos, los cuales se detallan también en el anexo V. El test de Kruskal-Wallis, versión no paramétrica del ANOVA para grupos pequeños, nos permitió comparar la variable cuantitativa entre grupos de edad, concluyéndose que la distribución del genotipo CYP2D6*4 es la misma entre categorías de rango de edad para un nivel de significancia de $p = 0,443$. Su presencia siempre era mayoritaria con respecto a otros alelos polimórficos y en cualquier rango de edad.

Los genotipos CYP2D6*9, *10 y *41 eran frecuentes en cualquier rango de edad, a diferencia de los polimorfismos CYP2D6*3, *5 y *6 que son muy poco frecuentes. También se constató que los genotipos con uno o dos alelos polimórficos no aumentaban con la edad.

En base a estas elevadas frecuencias de polimorfismos con baja actividad metabólica, se estudiaron un total de 100 casos clínicos de mujeres con cáncer de mama receptores estrogénicos positivos del Centro de Patología de la Mama Fundación Tejerina de Madrid, de los cuales fueron seleccionados sesenta y cinco coincidentes con los genotipos tipados en la población de referencia. En éstos se cuantificaron los niveles de tamoxifeno y sus metabolitos, así como el genotipo CYP2D6, en muestras de sangre previo consentimiento informado. A partir de estos datos, se estudió la variabilidad metabólica del tamoxifeno y sus metabolitos según

el grupo nativo CYP2D6*1, cuyo enzima es considerado por la comunidad científica como un metabolizador extensivo o normal. Ello nos permitió conocer en la población nativa cuál era la concentración media por metabolito de tamoxifeno, siempre y cuando se hubiera respetado una dosis terapéutica estándar de 20mg/día y un tiempo de estabilización del fármaco de 4 meses antes de realizar los niveles en sangre.

La presencia del grupo genético CYP2D6*1/*1 fue observado aproximadamente en el 60% de los informes analizados, lo que significaba a priori que algo más de la mitad de las pacientes en tratamiento con cáncer de mama presentaban un fenotipo metabólicamente extensivo, en el que la actividad metabólica por el tamoxifeno debía ser normal. Para el análisis de las variables continuas, como son las concentraciones de tamoxifeno y sus metabolitos (N-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno y endoxifeno), se aplicó de entrada un procedimiento descriptivo, observándose una distribución de las concentraciones muy amplia, con unas asimetría y curtosis significativas, especialmente con el 4-hidroxi-tamoxifeno. La prueba estadística de Kolmogorov-Smirnov (Test K-S de una muestra) permitió valorar la asunción de no normalidad para las variables cuantitativas. Las concentraciones para CYP2D6*1 fueron transformadas en su logaritmo (Anexo VII) a fin de poder transformar esa distribución anormal en normal, y así aplicar herramientas estadísticas paramétricas. Tras la transformación logarítmica, se observó una asimetría y una curtosis mínimas, y los gráficos Q-Q de normalidad, donde se representa la probabilidad observada acumulada con respecto a la probabilidad esperada, presentaron una desviación mínima de los residuos con respecto a la normalidad. En consecuencia, las distribuciones de los datos cumplían con una asimetría y una curtosis próximas o igual a cero.



Conceptos que se reafirmaron con las pruebas de normalidad realizadas a través del test de Kolmogorov-Smirnov (K-S de una muestra), donde $p > 0,05$.

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Log 10 Tamoxifeno (CYP2D6*1)	,120	40	,153	,972	40	,422
Log 10 N-Desmetil-Tamoxifeno (CYP2D6*1)	,087	40	,200*	,974	40	,488
Log 10 4-OH-Tamoxifeno (CYP2D6*1)	,094	40	,200*	,982	40	,779
Log 10 Endoxifeno (CYP2D6*1)	,073	40	,200*	,969	40	,335

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Así pues, se consiguió con esta transformación logarítmica una asunción de normalidad para las variables cuantitativas de concentración, permitiéndonos emplear los tests paramétricos, sin perder potencia estadística; además de poder construir intervalos de confianza.

La actividad metabólica del CYP2D6*1, como ya hemos comentado, se la describe bajo el patrón de metabolizador normal o extensivo; es decir, la actividad enzimática por el tamoxifeno es normal. Bajo esta premisa, se analizó estadísticamente cuál era el rango en concentración más probable para cada una de las moléculas analizadas cromatográficamente por HPLC-MS/MS. Para ello, se calculó la media y su desviación estándar. El rango de concentración normal fue el resultado de sumar y restar a la media calculada dos veces la desviación estándar. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas siguientes:

Estadísticos descriptivos					
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Log [4-OH-TAM]	41	,33	1,48	,8459	,23864
Log [Endoxifeno]	41	1,08	1,74	1,3534	,16745
Log [N-D-TAM]	41	2,22	2,79	2,5639	,12237
Log [TAM]	41	1,96	2,57	2,2629	,14278
N válido (según lista)	41				

	Rango Log ₁₀ (x)			
	Media Log10	SD Log10	Mínimo	Máximo
Tamoxifeno	2,26	0,14	1.98	2.55
N-desmetil-tamoxifeno	2,56	0,12	2.31	2.80
4-OH-tamoxifeno	0,84	0,23	0.36	1.32
Endoxifeno	1,35	0,16	1.01	1.68

Rangos de referencia para el tamoxifeno y sus metabolitos que engloban los valores de concentración del anexo VII en un intervalo de confianza del 95%.

Una de las preguntas que se formuló era cuántos casos clínicos se necesitan estudiar para establecer las diferencias en rango de concentración para una población genéticamente homogénea para el gen nativo CYP2D6*1. La respuesta simple y típica es cuanto más mejor; sin embargo, estadísticamente no es la respuesta correcta. No necesariamente debemos procesar más muestras, ya que ello es costoso y poco práctico. En nuestro caso decidimos calcular la "media acumulada", dato a dato, y compararlo con la media total. Para ello, se aplicó la "Prueba T de una muestra".

La conclusión a la que se llegó es que no existían diferencias significativas a partir de n=20 para ninguno de los metabolitos analizados (ver anexo VIII).

Llegado este punto, la pregunta que debíamos formularnos es si existen diferencias metabólicas para el tamoxifeno y sus metabolitos, según los tipos de polimorfismos genéticos CYP2D6 de baja actividad metabólica encontrados en la población de referencia. Interesaba conocer si presentaban una media igual o diferente entre grupos de datos según el tipo de polimorfismo CYP2D6. Recordemos que hemos obtenido en nuestra población de referencia un total de 13 polimorfismos, incluido el nativo o normal.

De los 65 casos clínicos antes mencionados, se agruparon según fuesen CYP2D6*3, *4, *5, *6, *9, *10 y *41, excluyéndose aquellos no coincidentes con los genotipos tipados en la población de referencia. Finalmente, un total de veinticuatro pacientes fueron coincidentes en genotipo con respecto a la población de referencia. Dichos datos se presentan en el Anexo VII. Recordemos que alguno de estos grupos tiene menos de dos casos polimórficos iguales. Por ello, se realizó un test de Kruskal-Wallis. Este test no paramétrico permitió comparar las medianas de las concentraciones en más de dos grupos independientes en los que el tamaño de la muestra es muy pequeño. La variable de agrupación fueron los polimorfismos genéticos de baja actividad metabólica CYP2D6*3, *4, *5, *6, *9, *10 y *41, los cuales fueron comparados respecto a la mediana de concentración para cada uno de los metabolitos de tamoxifeno obtenidos en la población nativa CYP2D6*1. Para este estudio estadístico se consideraron todos los datos logarítmicos del anexo VII. Los resultados obtenidos fueron:

Prueba de Kruskal-Wallis

Rangos			
	Polimorfismo CYP2D6	N	Rango promedio K-W
Log [4-OH-TAM]	2D6 1-1	41	39,85
	2D6 1-3	1	8,00
	2D6 1-4	15	22,90
	2D6 1-5	2	17,50
	2D6 1-6	1	31,00
	2D6 1-9	1	9,00
	2D6 1-10	1	41,50
	2D6 1-41	1	37,00
	2D6 4-41	2	3,00
	Total	65	
Log [Endoxifeno]	2D6 1-1	41	41,80
	2D6 1-3	1	12,00
	2D6 1-4	15	18,53
	2D6 1-5	2	22,50
	2D6 1-6	1	13,00
	2D6 1-9	1	19,00
	2D6 1-10	1	30,50
	2D6 1-41	1	30,50
	2D6 4-41	2	1,50
	Total	65	
Log [N-D-TAM]	2D6 1-1	41	30,78
	2D6 1-3	1	31,00
	2D6 1-4	15	39,10
	2D6 1-5	2	36,25
	2D6 1-6	1	36,50
	2D6 1-9	1	60,50
	2D6 1-10	1	65,00
	2D6 1-41	1	10,00
	2D6 4-41	2	10,50
	Total	65	
Log [TAM]	2D6 1-1	41	36,22
	2D6 1-3	1	13,00
	2D6 1-4	15	26,97
	2D6 1-5	2	42,50
	2D6 1-6	1	13,00
	2D6 1-9	1	46,50
	2D6 1-10	1	60,00
	2D6 1-41	1	35,00
	2D6 4-41	2	1,50
	Total	65	

Estadísticos de contraste ^a				
	Log [4-OH-TAM]	Log [Endoxifeno]	Log [N-D-TAM]	Log [TAM]
U de Mann-Whitney	143,500	94,000	226,000	218,500
W de Wilcoxon	263,500	214,000	1087,000	338,500
Z	-3,035	-3,951	-1,509	-1,648
Sig. asintót. (bilateral)	,002	,000	,131	,099

a. Variable de agrupación: Polimorfismo CYP2D6

La significación estadística en el caso de la molécula madre tamoxifeno, presentó una $p > 0,05$. Esta probabilidad nos indica que no podemos rechazar la hipótesis nula (H_0) de igualdad de medias entre grupos; es decir, tanto los genotipos nativos CYP2D6*1 como los genotipos polimórficos CYP2D6*3, *4, *5, *6, *9, *10 y *41 no se diferenciaban entre sus medianas en lo que al tamoxifeno como molécula madre se refiere.

A igual conclusión se llegó con el metabolito primario N-desmetil-tamoxifeno, aunque no para el otro metabolito primario 4-OH-tamoxifeno. A este respecto, no olvidemos que ambos acaban metabolizándose en endoxifeno por rutas metabólicas independientes, y que la comunidad científica sugiere que el endoxifeno es el principal metabolito activo responsable de la mayor eficacia del tamoxifeno en el tratamiento de cáncer de mama.

En cuanto al endoxifeno, se observó un valor en concentración mucho más bajo para cualquiera de los genotipos con baja actividad metabólica, tal y como se aprecia en la tabla 3.

Observación que, aún siendo reducido el número de casos clínicos estudiado, se confirma con una significación estadística $p < 0,05$ mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Ello nos lleva a rechazar la hipótesis nula (H_0) de igualdad de medianas, concluyéndose que los genotipos con al menos un alelo polimórfico de baja actividad metabólica presentan niveles de concentración de endoxifeno más

bajos con respecto al genotipo nativo CYP2D6*1. Qué decir cuando se juntan dos alelos polimórficos de baja actividad como acontecente en el genotipo CYP2D6*4/*41.

Variantes CYP2D6 v.s. tamoxifeno y metabolitos en pacientes					
Genotipo	Media log [TAM]	Media log [N-D-TAM]	Media log [Endoxi]	Media log [4-OH-TAM]	Media log [N-D-TAM] [Endoxi]
CYP2D6*1/*1	2,26	2,56	1,35	0,85	1,21
CYP2D6*1/*41	2,24	2,44	1,25	0,81	1,19
CYP2D6*1/*10	2,46	2,92	1,25	0,85	1,67
CYP2D6*1/*5	2,62	2,62	1,17	0,40	1,62
CYP2D6*1/*9	2,31	2,75	1,14	0,43	1,61
CYP2D6*1/*6	2,09	2,60	1,07	0,77	1,53
CYP2D6*1/*4	2,63	2,63	1,01	0,57	1,62
CYP2D6*1/*3	2,09	2,58	0,99	0,38	1,59
CYP2D6*4/*41	1,90	2,42	1,03	0,02	1,90

Tabla 4. Niveles logarítmicos de tamoxifeno y sus metabolitos (N-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno y endoxifeno) con respecto a los genotipos CYP2D6. Se resalta en amarillo las concentraciones medias obtenidas en la población nativa CYP2D6*1.

Esta última observación, nos lleva a pensar que es posible establecer una relación de actividad metabólica según combinación alélica del polimorfismo CYP2D6. Ello permitiría alertar al clínico de la posibilidad de que, en base al genotipo, la paciente pudiera no metabolizar el tamoxifeno y presentar concentraciones de endoxifeno por debajo de un umbral o rango de referencia, lo que conllevaría un posible riesgo de recurrencia de la enfermedad. Observación muy significativa, más cuando alrededor del 40% de los genotipos estudiados presenta al menos un alelo de baja actividad metabólica.

ANEXO IV. DATOS EXPERIMENTALES

Nº ID MUESTRA	EDAD	GENOTIPO
1	22	CYP2D6*1/*4
3	24	CYP2D6*1/*1
4	36	CYP2D6*1/*1
5	23	CYP2D6*1/*1
6	18	CYP2D6*1/*1
7	50	CYP2D6*1/*1
8	42	CYP2D6*1/*4
9	57	CYP2D6*1/*1
10	31	CYP2D6*1/*1
11	22	CYP2D6*1/*1
12	33	CYP2D6*1/*1
13	42	CYP2D6*1/*1
14	24	CYP2D6*1/*1
15	16	CYP2D6*1/*1
16	19	CYP2D6*1/*1
17	43	CYP2D6*1/*1
18	40	CYP2D6*1/*4
19	45	CYP2D6*1/*41
20	48	CYP2D6*1/*1
21	59	CYP2D6*1/*4
22	46	CYP2D6*1/*1
23	55	CYP2D6*1/*4
24	65	CYP2D6*1/*1
25	59	CYP2D6*1/*1
26	49	CYP2D6*1/*9
27	52	CYP2D6*1/*4
28	50	CYP2D6*1/*1
29	19	CYP2D6*1/*1
30	53	CYP2D6*1/*1
31	43	CYP2D6*1/*1
32	30	CYP2D6*1/*1
33	18	CYP2D6*1/*41
34	40	CYP2D6*1/*1
35	46	CYP2D6*1/*1
36	50	CYP2D6*1/*3
37	35	CYP2D6*1/*1
38	18	CYP2D6*1/*1
39	34	CYP2D6*1/*4
41	38	CYP2D6*1/*1
42	22	CYP2D6*1/*1
43	17	CYP2D6*1/*1
44	17	CYP2D6*1/*1
45	36	CYP2D6*1/*1
47	26	CYP2D6*1/*1
48	36	CYP2D6*1/*4
49	37	CYP2D6*1/*1
50	49	CYP2D6*1/*1
51	59	CYP2D6*1/*1
52	26	CYP2D6*1/*4
53	74	CYP2D6*1/*1
54	38	CYP2D6*1/*1
55	21	CYP2D6*1/*4
56	41	CYP2D6*1/*1

57	27	CYP2D6*1/*4
58	52	CYP2D6*1/*1
59	35	CYP2D6*1/*1
60	57	CYP2D6*1/*1
61	52	CYP2D6*1/*1
62	42	CYP2D6*1/*1
64	40	CYP2D6*1/*1
65	36	CYP2D6*1/*1
66	66	CYP2D6*1/*1
68	65	CYP2D6*1/*6
69	39	CYP2D6*1/*1
70	35	CYP2D6*1/*1
71	49	CYP2D6*1/*4
72	67	CYP2D6*1/*1
73	68	CYP2D6*1/*1
74	26	CYP2D6*1/*1
76	32	CYP2D6*1/*1
77	54	CYP2D6*1/*1
79	22	CYP2D6*1/*1
80	43	CYP2D6*1/*1
81	57	CYP2D6*1/*1
82	45	CYP2D6*1/*1
83	17	CYP2D6*1/*4
84	63	CYP2D6*1/*4
85	44	CYP2D6*4/*9
86	17	CYP2D6*1/*9
87	64	CYP2D6*1/*4
89	23	CYP2D6*1/*1
90	25	CYP2D6*1/*4
91	65	CYP2D6*1/*4
92	30	CYP2D6*1/*1
93	18	CYP2D6*1/*1
94	51	CYP2D6*1/*1
96	60	CYP2D6*1/*1
97	58	CYP2D6*1/*41
98	56	CYP2D6*1/*4
99	30	CYP2D6*1/*1
100	19	CYP2D6*4/*9
101	30	CYP2D6*1/*1
102	27	CYP2D6*1/*1
103	22	CYP2D6*1/*9
104	45	CYP2D6*1/*1
105	62	CYP2D6*1/*4
106	37	CYP2D6*1/*1
107	66	CYP2D6*1/*3
108	51	CYP2D6*4/*9
109	58	CYP2D6*1/*1
110	64	CYP2D6*1/*1
111	20	CYP2D6*1/*1
112	44	CYP2D6*1/*1
113	34	CYP2D6*1/*1
114	45	CYP2D6*1/*9
115	49	CYP2D6*1/*1
116	42	CYP2D6*1/*1
117	22	CYP2D6*1/*1
118	21	CYP2D6*1/*1
119	73	CYP2D6*1/*1

120	20	CYP2D6*1/*1
121	50	CYP2D6*1/*1
122	51	CYP2D6*1/*1
123	44	CYP2D6*1/*1
124	45	CYP2D6*4/*4
125	60	CYP2D6*1/*1
126	24	CYP2D6*1/*1
127	60	CYP2D6*1/*1
128	51	CYP2D6*1/*1
129	56	CYP2D6*1/*1
130	61	CYP2D6*1/*1
131	25	CYP2D6*1/*9
132	50	CYP2D6*1/*4
133	32	CYP2D6*1/*4
134	41	CYP2D6*1/*4
135	17	CYP2D6*1/*4
136	64	CYP2D6*1/*4
137	45	CYP2D6*1/*1
138	50	CYP2D6*1/*1
139	58	CYP2D6*1/*1
140	71	CYP2D6*1/*4
141	36	CYP2D6*1/*1
142	60	CYP2D6*1/*4
143	23	CYP2D6*1/*1
144	45	CYP2D6*1/*4
145	52	CYP2D6*1/*4
146	69	CYP2D6*1/*1
147	40	CYP2D6*1/*4
148	18	CYP2D6*1/*1
149	58	CYP2D6*1/*1
150	36	CYP2D6*1/*1
151	42	CYP2D6*1/*9
152	40	CYP2D6*1/*1
153	45	CYP2D6*1/*1
154	25	CYP2D6*1/*1
155	18	CYP2D6*1/*1
156	17	CYP2D6*1/*4
157	17	CYP2D6*1/*4
158	21	CYP2D6*1/*4
159	33	CYP2D6*1/*4
160	74	CYP2D6*1/*4
161	46	CYP2D6*1/*1
162	16	CYP2D6*1/*4
163	52	CYP2D6*1/*1
164	22	CYP2D6*1/*1
165	31	CYP2D6*1/*1
167	54	CYP2D6*1/*4
168	70	CYP2D6*1/*1
169	63	CYP2D6*1/*1
170	48	CYP2D6*1/*1
171	70	CYP2D6*1/*4
172	55	CYP2D6*1/*4
173	73	CYP2D6*1/*1
174	44	CYP2D6*1/*4
175	72	CYP2D6*1/*4
176	27	CYP2D6*1/*4
177	21	CYP2D6*1/*4

178	20	CYP2D6*1/*4
179	52	CYP2D6*1/*4
180	64	CYP2D6*1/*1
181	35	CYP2D6*1/*4
182	20	CYP2D6*1/*4
183	73	CYP2D6*1/*1
184	19	CYP2D6*1/*1
185	30	CYP2D6*1/*4
186	22	CYP2D6*1/*1
187	63	CYP2D6*1/*1
188	36	CYP2D6*1/*1
189	61	CYP2D6*1/*4
190	46	CYP2D6*1/*4
191	61	CYP2D6*1/*1
192	30	CYP2D6*1/*4
193	29	CYP2D6*1/*1
194	60	CYP2D6*1/*4
195	25	CYP2D6*1/*4
196	58	CYP2D6*1/*4
197	36	CYP2D6*1/*4
198	43	CYP2D6*1/*1
199	60	CYP2D6*1/*1
200	43	CYP2D6*1/*1
201	44	CYP2D6*1/*1
202	17	CYP2D6*1/*1
203	49	CYP2D6*1/*1
204	52	CYP2D6*1/*9
205	29	CYP2D6*1/*1
206	55	CYP2D6*1/*1
207	75	CYP2D6*1/*4
208	30	CYP2D6*1/*4
209	17	CYP2D6*1/*10
210	64	CYP2D6*1/*10
211	28	CYP2D6*1/*1
212	63	CYP2D6*1/*1
213	39	CYP2D6*1/*1
214	22	CYP2D6*1/*1
215	53	CYP2D6*1/*1
216	58	CYP2D6*1/*1
217	60	CYP2D6*1/*9
218	74	CYP2D6*1/*4
219	64	CYP2D6*1/*1
220	21	CYP2D6*1/*3
221	42	CYP2D6*1/*4
222	29	CYP2D6*1/*1
223	29	CYP2D6*6/*4
224	45	CYP2D6*1/*9
225	71	CYP2D6*1/*1
226	45	CYP2D6*1/*4
227	63	CYP2D6*1/*4
228	48	CYP2D6*1/*1
229	72	CYP2D6*1/*1
230	20	CYP2D6*1/*1
231	46	CYP2D6*1/*4
232	24	CYP2D6*1/*1
233	75	CYP2D6*1/*1
234	56	CYP2D6*1/*4

235	27	CYP2D6*1/*9
236	23	CYP2D6*1/*1
237	22	CYP2D6*1/*3
238	64	CYP2D6*1/*1
239	80	CYP2D6*1/*1
240	18	CYP2D6*1/*1
241	54	CYP2D6*1/*1
242	65	CYP2D6*1/*1
243	52	CYP2D6*1/*4
244	24	CYP2D6*1/*4
245	17	CYP2D6*1/*4
246	51	CYP2D6*5/*4
247	18	CYP2D6*1/*1
248	38	CYP2D6*1/*1
249	75	CYP2D6*1/*1
250	76	CYP2D6*1/*1
251	52	CYP2D6*1/*1
252	46	CYP2D6*1/*4
253	68	CYP2D6*1/*10
254	38	CYP2D6*1/*1
255	63	CYP2D6*1/*1
256	55	CYP2D6*1/*1
257	80	CYP2D6*1/*1
258	23	CYP2D6*1/*1
259	73	CYP2D6*1/*41
260	59	CYP2D6*1/*1
261	28	CYP2D6*1/*1
262	65	CYP2D6*1/*1
263	65	CYP2D6*1/*1
264	46	CYP2D6*1/*1
265	39	CYP2D6*1/*4
266	81	CYP2D6*1/*1
267	44	CYP2D6*1/*3
268	37	CYP2D6*1/*1
269	32	CYP2D6*1/*41
270	37	CYP2D6*1/*41
271	34	CYP2D6*1/*10
272	45	CYP2D6*1/*1
273	58	CYP2D6*1/*1
274	56	CYP2D6*1/*4
275	52	CYP2D6*1/*9
276	30	CYP2D6*1/*4
277	27	CYP2D6*1/*1
278	21	CYP2D6*1/*1
279	81	CYP2D6*1/*1
280	70	CYP2D6*1/*1
281	80	CYP2D6*1/*1
282	74	CYP2D6*1/*1
283	77	CYP2D6*1/*4
284	35	CYP2D6*1/*4
285	68	CYP2D6*1/*1
286	76	CYP2D6*1/*10
287	29	CYP2D6*1/*4
288	33	CYP2D6*1/*1
289	33	CYP2D6*1/*1
290	66	CYP2D6*1/*1
291	77	CYP2D6*1/*1

292	76	CYP2D6*1/*1
293	32	CYP2D6*1/*1
294	67	CYP2D6*1/*1
295	77	CYP2D6*1/*10
296	66	CYP2D6*1/*4
297	29	CYP2D6*1/*4
298	63	CYP2D6*1/*4
299	74	CYP2D6*1/*4
300	72	CYP2D6*1/*4
301	74	CYP2D6*1/*1
302	69	CYP2D6*1/*1
303	37	CYP2D6*1/*1
304	70	CYP2D6*1/*4
305	29	CYP2D6*1/*1
306	31	CYP2D6*1/*4
307	29	CYP2D6*1/*4
308	82	CYP2D6*1/*10
309	28	CYP2D6*1/*1
310	33	CYP2D6*1/*1
311	29	CYP2D6*1/*1
312	51	CYP2D6*1/*4
313	59	CYP2D6*1/*4
314	57	CYP2D6*1/*1
315	28	CYP2D6*1/*1
316	37	CYP2D6*1/*1
337	31	CYP2D6*1/*1
338	15	CYP2D6*1/*1
339	34	CYP2D6*1/*41
340	36	CYP2D6*1/*10
341	40	CYP2D6*1/*4
342	56	CYP2D6*1/*4
343	45	CYP2D6*1/*1
344	28	CYP2D6*1/*41
345	45	CYP2D6*1/*1
346	58	CYP2D6*1/*4
347	29	CYP2D6*1/*4
348	64	CYP2D6*1/*1
349	41	CYP2D6*1/*4
350	40	CYP2D6*1/*1
351	35	CYP2D6*5/*4
352	42	CYP2D6*1/*1
353	59	CYP2D6*1/*1
354	27	CYP2D6*1/*9
355	64	CYP2D6*1/*1
356	52	CYP2D6*1/*9
357	32	CYP2D6*1/*1
358	27	CYP2D6*1/*9
359	16	CYP2D6*1/*41
360	61	CYP2D6*1/*1
361	16	CYP2D6*1/*41
362	33	CYP2D6*1/*1
363	59	CYP2D6*1/*1
364	17	CYP2D6*4/*41
365	69	CYP2D6*1/*1
366	65	CYP2D6*1/*4
367	60	CYP2D6*1/*1
368	17	CYP2D6*1/*41

369	62	CYP2D6*1/*10
370	65	CYP2D6*1/*41
371	65	CYP2D6*1/*1
372	41	CYP2D6*1/*41
373	62	CYP2D6*1/*1
374	61	CYP2D6*1/*1
375	66	CYP2D6*1/*9
376	65	CYP2D6*1/*1
377	68	CYP2D6*1/*1
378	67	CYP2D6*1/*1
379	67	CYP2D6*1/*10
380	67	CYP2D6*1/*1
381	67	CYP2D6*1/*4
382	67	CYP2D6*1/*1
383	68	CYP2D6*1/*9
385	47	CYP2D6*1/*1
387	60	CYP2D6*1/*1
388	36	CYP2D6*1/*41
389	35	CYP2D6*1/*4
391	87	CYP2D6*1/*4
392	38	CYP2D6*1/*4
393	29	CYP2D6*1/*1
394	55	CYP2D6*1/*4
395	55	CYP2D6*1/*1
396	52	CYP2D6*1/*1
397	52	CYP2D6*1/*1
398	67	CYP2D6*1/*1
399	59	CYP2D6*1/*1
400	36	CYP2D6*1/*1
401	19	CYP2D6*1/*1
402	36	CYP2D6*1/*1
403	77	CYP2D6*1/*1
404	34	CYP2D6*9/*4
405	63	CYP2D6*1/*4
406	43	CYP2D6*1/*4
408	33	CYP2D6*1/*1
409	19	CYP2D6*1/*1
410	40	CYP2D6*9/*4
413	69	CYP2D6*1/*4
414	59	CYP2D6*1/*1
415	18	CYP2D6*1/*4
416	36	CYP2D6*1/*41
417	29	CYP2D6*1/*4
419	73	CYP2D6*1/*1
420	48	CYP2D6*1/*1
421	55	CYP2D6*1/*1
422	26	CYP2D6*1/*1
423	70	CYP2D6*3/*10
424	28	CYP2D6*9/*4
425	57	CYP2D6*1/*10
426	17	CYP2D6*1/*1
427	40	CYP2D6*1/*10
428	19	CYP2D6*1/*41
429	48	CYP2D6*1/*1
430	36	CYP2D6*1/*4
431	85	CYP2D6*1/*1
432	62	CYP2D6*1/*1

433	57	CYP2D6*9/*4
434	56	CYP2D6*1/*4
435	47	CYP2D6*1/*1
436	22	CYP2D6*1/*1
437	82	CYP2D6*1/*1
438	39	CYP2D6*1/*9
439	37	CYP2D6*1/*9
441	59	CYP2D6*1/*4
442	74	CYP2D6*1/*1
443	36	CYP2D6*1/*1
445	17	CYP2D6*1/*1
446	30	CYP2D6*1/*1
447	24	CYP2D6*1/*4
448	18	CYP2D6*1/*1
449	54	CYP2D6*1/*4
450	50	CYP2D6*1/*1
451	62	CYP2D6*1/*1
452	19	CYP2D6*1/*4
453	49	CYP2D6*1/*1
454	41	CYP2D6*1/*9
455	45	CYP2D6*1/*1
456	84	CYP2D6*1/*4
457	24	CYP2D6*1/*4
459	50	CYP2D6*3/*4
460	55	CYP2D6*9/*4
461	16	CYP2D6*1/*1
462	58	CYP2D6*1/*1
463	34	CYP2D6*1/*1

ANEXO V. AGRUPACIÓN GENOTIPOS CYP2D6 vs RANGO DE EDADES

POBLACIÓN DE REFERENCIA COMUNIDAD DE MADRID											
15-19 (n = 38)	20-24 (n = 34)	25-29 (n = 33)	30-34 (n = 31)	35-39 (n = 38)	40-44 (n = 33)	45-49 (n = 34)	50-54 (n = 33)	55-59 (n = 39)	60-64 (n = 36)	65-69 (n = 32)	70-100 (n = 42)
2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-41	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-1
2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-4	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-1
2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-6	2D6 1-4
2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-9	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-4
2D6 1-41	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-3	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1
2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-4
2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-9	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-3	2D6 1-1
2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-41	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-4
2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-1
2D6 1-9	2D6 1-9	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-9	2D6 4-9	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-10	2D6 1-4
2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 4-9	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-4
2D6 4-9	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 4-41	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1
2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1
2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-4	2D6 1-4	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-1
2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 6-41	2D6 1-4	2D6 1-4	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1
2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-9	2D6 1-41	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-4	2D6 1-1
2D6 1-4	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-10	2D6 1-41	2D6 1-9	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1
2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-4	2D6 1-4	2D6 1-10	2D6 1-1	2D6 1-1
2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-41
2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-9	2D6 1-9	2D6 1-1	2D6 1-9	2D6 1-41	2D6 1-1
2D6 1-10	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1
2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-41	2D6 1-9	2D6 1-1
2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-41	2D6 1-4	2D6 1-4	2D6 1-4	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1
2D6 1-1	2D6 1-3	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-3	2D6 1-4	2D6 1-5	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1
2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-41	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-4
2D6 1-41	2D6 1-1	2D6 1-41	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-9	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-10	2D6 1-10
2D6 1-41	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-10	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1
2D6 4-41	2D6 1-3	2D6 1-9	2D6 4-9	2D6 1-5	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-9	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-1
2D6 1-41	2D6 1-4	2D6 1-9	2D6 1-1	2D6 1-41	2D6 1-41	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-10
2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-10	2D6 1-9	2D6 1-4
2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 4-9	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-4
2D6 1-4	2D6 1-1	2D6 1-1		2D6 1-1	2D6 1-10	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 1-1
2D6 1-1	2D6 1-4	2D6 4-9		2D6 1-1	2D6 1-9	2D6 1-1	2D6 3-4	2D6 1-1	2D6 1-1		2D6 1-4
2D6 1-41	2D6 1-4			2D6 1-41		2D6 1-1		2D6 1-10	2D6 1-4		2D6 1-10
2D6 1-1				2D6 1-4				2D6 4-9	2D6 1-1		2D6 1-4
2D6 1-1				2D6 1-9				2D6 1-4	2D6 1-1		2D6 1-1
2D6 1-4				2D6 1-9				2D6 1-41			2D6 1-1
2D6 1-1				2D6 1-1				2D6 4-9			2D6 3-10
								2D6 1-1			2D6 1-1
											2D6 1-1
											2D6 1-1
											2D6 1-4

ANEXO VI. POBLACIÓN REFERENCIA POR RANGO DE EDADES

GENOTIPO (n=423)	AGRUPACIÓN GENOTIPOS											
	15-19 (n = 38)	20-24 (n = 34)	25-29 (n = 33)	30-34 (n = 31)	35-39 (n = 38)	40-44 (n = 33)	45-49 (n = 34)	50-54 (n = 33)	55-59 (n = 39)	60-64 (n = 36)	65-69 (n = 32)	70-100 (n = 42)
2D6 1-1	55,3%	64,7%	48,5%	61,3%	60,5%	51,5%	67,6%	54,5%	56,4%	63,9%	62,5%	59,5%
2D6 1-4	21,1%	26,5%	30,3%	25,8%	18,4%	27,3%	17,6%	24,2%	30,8%	25,0%	15,6%	28,6%
2D6 1-41	13,2%	ND	3,0%	6,5%	10,5%	3,0%	2,9%	ND	5,1%	2,8%	3,1%	2,4%
2D6 1-10	2,6%	ND	ND	3,2%	2,6%	3,0%	ND	ND	2,6%	5,6%	6,3%	7,1%
2D6 1-9	2,6%	2,9%	12,1%	ND	5,3%	6,1%	8,8%	9,1%	ND	2,8%	6,3%	ND
2D6 1-3	ND	5,9%	ND	ND	ND	3,0%	ND	3,0%	ND	ND	3,1%	ND
2D6 4-41	2,6%	ND	ND	ND	ND	ND	2,9%	ND	ND	ND	ND	ND
2D6 4-9	2,6%	ND	3,0%	3,2%	ND	6,1%	ND	3,0%	5,1%	ND	ND	ND
2D6 6-41	ND	ND	3,0%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2D6 1-5	ND	ND	ND	ND	2,6%	ND	ND	3,0%	ND	ND	ND	ND
2D6 3-4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3,0%	ND	ND	ND	ND
2D6 1-6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3,1%	ND
2D6 3-10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2,4%
TOTAL =	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

	AGRUPACIÓN DIPLOTIPOS SEGÚN NÚMERO ALELOS POLIMÓRFICOS											
	15-19 (n = 38)	20-24 (n = 34)	25-29 (n = 33)	30-34 (n = 31)	35-39 (n = 38)	40-44 (n = 33)	45-49 (n = 34)	50-54 (n = 33)	55-59 (n = 39)	60-64 (n = 36)	65-69 (n = 32)	70-100 (n = 42)
DIPLOTIPOS POLIMÓRFICOS DE UN ALELO	39,5%	35,3%	45,5%	35,5%	39,5%	42,4%	29,4%	39,4%	38,4%	36,1%	34,4%	38,1%
DIPLOTIPOS POLIMÓRFICOS DE DOS ALELOS	5,3%	0,0%	6,1%	3,2%	0,0%	6,1%	2,9%	6,1%	5,1%	0,0%	3,1%	2,4%
POLIMORFISMOS TOTALES	44,7%	35,3%	51,5%	38,7%	39,5%	48,5%	32,3%	36,4%	43,6%	36,1%	31,2%	38,1%

ANEXO VII. CONCENTRACIÓN TAMOXIFENO Y METABOLITOS vs GENOTIPO CYP2D6

Polimorfismos CYP2D6	4OH-TAM (ng/mL) ⁽¹⁾	Endoxifeno (ng/mL) ⁽¹⁾	N-D-TAM (ng/mL) ⁽¹⁾	Tamoxifeno (ng/mL) ⁽¹⁾	Ratio ⁽¹⁾ = $\frac{\text{N-D-TAM}}{\text{Endoxifeno}}$
CYP2D6*1/*1	0,90	1,42	2,68	2,24	1,26
CYP2D6*1/*1	1,18	1,74	2,59	2,20	0,85
CYP2D6*1/*1	1,09	1,61	2,52	2,25	0,91
CYP2D6*1/*1	0,91	1,18	2,59	2,09	1,41
CYP2D6*1/*1	0,49	1,23	2,43	2,18	1,20
CYP2D6*1/*1	1,06	1,67	2,51	2,21	0,84
CYP2D6*1/*1	0,83	1,40	2,42	2,25	1,02
CYP2D6*1/*1	1,12	1,72	2,36	2,06	0,64
CYP2D6*1/*1	1,02	1,59	2,55	2,22	0,96
CYP2D6*1/*1	0,55	1,08	2,63	2,27	1,55
CYP2D6*1/*1	0,52	1,15	2,52	2,03	1,37
CYP2D6*1/*1	1,02	1,50	2,58	2,18	1,08
CYP2D6*1/*1	0,95	1,45	2,67	2,42	1,22
CYP2D6*1/*1	0,92	1,39	2,79	2,52	1,40
CYP2D6*1/*1	0,69	1,30	2,60	2,41	1,30
CYP2D6*1/*1	0,79	1,12	2,48	2,07	1,36
CYP2D6*1/*1	1,48	1,46	2,60	2,33	1,14
CYP2D6*1/*1	0,33	1,09	2,50	2,18	1,41
CYP2D6*1/*1	0,68	1,16	2,51	2,21	1,35
CYP2D6*1/*1	0,83	1,31	2,63	2,35	1,32
CYP2D6*1/*1	0,82	1,30	2,63	2,39	1,33
CYP2D6*1/*1	0,57	1,26	2,45	2,22	1,19
CYP2D6*1/*1	0,85	1,21	2,69	2,43	1,48
CYP2D6*1/*1	0,88	1,35	2,41	2,12	1,06
CYP2D6*1/*1	0,96	1,48	2,73	2,48	1,25
CYP2D6*1/*1	0,79	1,40	2,68	2,24	1,28
CYP2D6*1/*1	0,74	1,36	2,58	2,31	1,22
CYP2D6*1/*1	0,56	1,26	2,60	2,13	1,34
CYP2D6*1/*1	0,57	1,21	2,68	2,44	1,47
CYP2D6*1/*1	1,06	1,28	2,71	2,36	1,43
CYP2D6*1/*1	0,55	1,27	2,39	2,13	1,12
CYP2D6*1/*1	0,51	1,19	2,39	2,09	1,20
CYP2D6*1/*1	0,96	1,49	2,69	2,32	1,20
CYP2D6*1/*1	0,86	1,36	2,73	2,50	1,37
CYP2D6*1/*1	0,94	1,31	2,73	2,57	1,42
CYP2D6*1/*1	1,02	1,38	2,63	2,21	1,25
CYP2D6*1/*1	1,21	1,28	2,22	1,96	0,94
CYP2D6*1/*1	0,76	1,34	2,49	2,27	1,15
CYP2D6*1/*1	0,70	1,44	2,46	2,27	1,02
CYP2D6*1/*1	0,80	1,17	2,50	2,25	1,33
CYP2D6*1/*1	1,21	1,58	2,57	2,42	0,99
CYP2D6*1/*3	0,38	0,99	2,58	2,09	1,59
CYP2D6*1/*4	0,86	1,39	2,69	2,22	1,30
CYP2D6*1/*4	0,75	1,28	2,39	2,03	1,11
CYP2D6*1/*4	0,97	1,29	2,80	2,55	1,51
CYP2D6*1/*4	0,75	1,45	2,57	2,09	1,12
CYP2D6*1/*4	0,45	1,18	2,70	2,34	1,52
CYP2D6*1/*4	0,27	0,73	2,79	2,29	2,06
CYP2D6*1/*4	0,92	1,08	2,68	2,18	1,60

CYP2D6*1/*4	0,70	0,73	2,79	2,37	2,06
CYP2D6*1/*4	0,45	0,69	2,65	2,22	1,96
CYP2D6*1/*4	0,80	0,82	2,69	2,22	1,87
CYP2D6*1/*4	0,53	0,79	2,55	2,11	1,76
CYP2D6*1/*4	0,51	0,95	2,72	2,20	1,77
CYP2D6*1/*4	0,53	0,94	2,48	1,95	1,54
CYP2D6*1/*4	0,02	0,97	2,49	2,08	1,52
CYP2D6*1/*4	0,02	0,81	2,48	2,05	1,67
CYP2D6*1/*5	0,78	1,13	2,66	2,30	1,53
CYP2D6*1/*5	0,02	1,21	2,57	2,26	1,36
CYP2D6*1/*6	0,77	1,07	2,60	2,09	1,53
CYP2D6*1/*9	0,43	1,14	2,75	2,31	1,61
CYP2D6*1/*10	0,85	1,25	2,92	2,46	1,67
CYP2D6*1/*41	0,81	1,25	2,44	2,24	1,19
CYP2D6*4/*41	0,02	0,64	2,50	1,94	1,86
CYP2D6*4/*41	0,02	0,39	2,33	1,85	1,94

(1) Logaritmo concentraciones de tamoxifeno y sus metabolitos en pacientes mujeres con cáncer de mama. Muestras de sangre extraídas cuatro meses después del inicio tratamiento con tamoxifeno.

ANEXO VIII. TAMOXIFENO: CONTRASTE MEDIA ACUMULADA vs MEDIA TOTAL

#	Genotipo	log [TAM]	Media acumulada log[TAM]	Prueba T para una muestra Sig (bilateral)	log [Endoxifeno]	Media acumulada log[Endoxifeno]	Prueba T para una muestra Sig (bilateral)	log [4-OH-TAM]	Media acumulada log[4-OH-TAM]	Prueba T para una muestra Sig (bilateral)	log [N-D-TAM]	Media acumulada log[N-D-TAM]	Prueba T para una muestra Sig (bilateral)
1	CYP2D6*1/*1	2,240	2,240	0,161	1,420	1,420	0,021	0,900	0,900	0,100	2,680	2,680	0,000
2	CYP2D6*1/*1	2,200	2,220	0,024	1,740	1,580	0,000	1,180	1,040	0,000	2,590	2,635	0,001
3	CYP2D6*1/*1	2,250	2,230	0,066	1,610	1,590	0,000	1,090	1,057	0,000	2,520	2,597	0,177
4	CYP2D6*1/*1	2,090	2,195	0,001	1,180	1,488	0,000	0,910	1,020	0,000	2,590	2,595	0,215
5	CYP2D6*1/*1	2,180	2,192	0,001	1,230	1,436	0,005	0,490	0,914	0,046	2,430	2,562	0,533
6	CYP2D6*1/*1	2,210	2,195	0,001	1,670	1,475	0,000	1,060	0,938	0,010	2,510	2,553	0,260
7	CYP2D6*1/*1	2,250	2,203	0,003	1,400	1,464	0,000	0,830	0,923	0,027	2,420	2,534	0,032
8	CYP2D6*1/*1	2,060	2,185	0,000	1,720	1,496	0,000	1,120	0,948	0,005	2,360	2,513	0,001
9	CYP2D6*1/*1	2,220	2,189	0,001	1,590	1,507	0,000	1,020	0,956	0,003	2,550	2,517	0,003
10	CYP2D6*1/*1	2,270	2,197	0,001	1,080	1,464	0,000	0,550	0,915	0,043	2,630	2,528	0,014
11	CYP2D6*1/*1	2,030	2,182	0,000	1,150	1,435	0,005	0,520	0,879	0,270	2,520	2,527	0,012
12	CYP2D6*1/*1	2,180	2,182	0,000	1,500	1,441	0,003	1,020	0,891	0,157	2,580	2,532	0,024
13	CYP2D6*1/*1	2,420	2,200	0,002	1,450	1,442	0,003	0,950	0,895	0,129	2,670	2,542	0,084
14	CYP2D6*1/*1	2,520	2,223	0,032	1,390	1,438	0,004	0,920	0,897	0,117	2,790	2,560	0,462
15	CYP2D6*1/*1	2,410	2,235	0,104	1,300	1,429	0,009	0,690	0,883	0,227	2,600	2,563	0,571
16	CYP2D6*1/*1	2,070	2,225	0,040	1,120	1,409	0,053	0,790	0,878	0,282	2,480	2,558	0,397
17	CYP2D6*1/*1	2,330	2,231	0,072	1,460	1,412	0,041	1,480	0,913	0,049	2,600	2,560	0,462
18	CYP2D6*1/*1	2,180	2,207	0,005	1,090	1,466	0,000	0,330	0,932	0,015	2,500	2,562	0,533
19	CYP2D6*1/*1	2,210	2,227	0,049 (1)	1,160	1,382	0,331 (1)	0,680	0,870	0,387 (1)	2,510	2,554	0,284 (1)
20	CYP2D6*1/*1	2,350	2,234	0,095	1,310	1,379	0,389	0,830	0,868	0,416	2,630	2,558	0,397
21	CYP2D6*1/*1	2,390	2,241	0,174	1,300	1,375	0,475	0,820	0,866	0,447	2,630	2,561	0,497
22	CYP2D6*1/*1	2,220	2,240	0,161	1,260	1,370	0,596	0,570	0,852	0,698	2,450	2,556	0,337

23	CYP2D6*1/*1	2,430	2,248	0,296	1,210	1,363	0,787	0,850	0,852	0,698	2,690	2,562	0,533
24	CYP2D6*1/*1	2,120	2,243	0,204	1,350	1,362	0,816	0,880	0,853	0,679	2,410	2,556	0,337
25	CYP2D6*1/*1	2,480	2,252	0,387	1,480	1,367	0,676	0,960	0,858	0,584	2,730	2,563	0,571
26	CYP2D6*1/*1	2,240	2,252	0,387	1,400	1,368	0,649	0,790	0,855	0,640	2,680	2,567	0,734
27	CYP2D6*1/*1	2,310	2,254	0,439	1,360	1,368	0,649	0,740	0,851	0,718	2,580	2,568	0,777
28	CYP2D6*1/*1	2,130	2,250	0,340	1,260	1,364	0,759	0,560	0,840	0,947	2,600	2,569	0,821
29	CYP2D6*1/*1	2,440	2,256	0,495	1,210	1,359	0,904	0,570	0,831	0,861	2,680	2,573	0,999
30	CYP2D6*1/*1	2,360	2,260	0,618	1,280	1,356	0,993	1,060	0,839	0,969	2,710	2,577	0,820
31	CYP2D6*1/*1	2,130	2,255	0,467	1,270	1,353	0,918	0,550	0,829	0,819	2,390	2,571	0,910
32	CYP2D6*1/*1	2,090	2,250	0,340	1,190	1,348	0,773	0,510	0,819	0,620	2,390	2,566	0,692
33	CYP2D6*1/*1	2,320	2,252	0,387	1,490	1,352	0,889	0,960	0,824	0,717	2,690	2,569	0,821
34	CYP2D6*1/*1	2,500	2,260	0,618	1,360	1,353	0,918	0,860	0,825	0,737	2,730	2,574	0,954
35	CYP2D6*1/*1	2,570	2,269	0,932	1,310	1,351	0,859	0,940	0,828	0,798	2,730	2,579	0,733
36	CYP2D6*1/*1	2,210	2,267	0,859	1,380	1,352	0,889	1,020	0,833	0,903	2,630	2,580	0,690
37	CYP2D6*1/*1	2,270	2,267	0,859	1,340	1,352	0,889	0,760	0,831	0,861	2,490	2,578	0,776
38	CYP2D6*1/*1	2,270	2,267	0,859	1,440	1,354	0,948	0,700	0,828	0,798	2,460	2,574	0,954
39	CYP2D6*1/*1	2,250	2,267	0,859	1,170	1,349	0,904	0,800	0,827	0,778	2,500	2,573	0,999
40	CYP2D6*1/*1	2,420	2,271	0,995	1,580	1,355	0,978	1,210	0,837	0,989	2,570	2,573	0,999
Media Total=		2,271	Media Total=		1,355	Media Total=		0,837	Media Total=		2,573		

Contraste, mediante la Prueba T de una muestra, de la concentración media acumulada de tamoxifeno y sus metabolitos con respecto a la media total (N=40). La prueba T indica que con 20 casos se obtiene las mismas conclusiones que para cuarenta. Se acepta la hipótesis nula (H₀), igualdad de medias acumuladas y total, cuando existe una significancia de $p > 0.05$ y ello se cumple a partir de la muestra n° 20 ⁽¹⁾. Cualquiera de los metabolitos cumple esta condición; así pues, se concluye que este tamaño de muestra, aún siendo pequeño, es suficiente para el objeto de esta tesis.

7. DISCUSIÓN

7.1 DISCUSIÓN SOBRE LA POBLACIÓN DE REFERENCIA ESTUDIADA

El subgrupo de 423 mujeres de la Comunidad Autónoma de Madrid, denominado población de referencia, nos ha servido para estudiar el tipo de variantes genéticas CYP2D6 de baja actividad metabólica y sus frecuencias alélicas en la población asistencial. Consideramos que la frecuencia de cada variante alélica debe ser conocida previamente, ya que en la literatura existen numerosos trabajos ^(2, 48, 192, 193) que han sido tema de controversia al existir variaciones entre los grupos poblacionales en función de los alelos polimórficos CYP2D6 y de sus frecuencias, así como inconsistencias ^(44, 62, 80, 130, 131, 194, 196) en la adscripción de un diplotipo ⁽¹⁹⁶⁾ a un fenotipo metabólico ⁹⁹, actualmente dividido en metabolizadores pobres (MP), intermedios (MI), extensivos (ME) y ultrarrápidos (MU) ^(2, 48).

No hemos encontrado en la literatura datos demográficos de mujeres madrileñas sanas en relación con las frecuencias de los polimorfismos CYP2D6 de baja actividad metabólica, si bien existían trabajos en pacientes con cáncer de mama y de otras regiones de España ^(188, 189). Resaltar los trabajos de Menoyo ⁽⁵²⁾ y Crescenti⁽¹⁹⁰⁾ por su similitud en el tipo de población, estudian un subgrupo caucásico sano de la ciudad de Barcelona en base a un tamaño muestral de ciento cinco y doscientos noventa voluntarios, respectivamente; así como, el trabajo de Almoguera ⁽¹⁹¹⁾ que estudia ciento cincuenta y cinco voluntarios sanos procedentes de Madrid y Badajoz. En ninguno de estos trabajos se diferenciaba el sexo y la edad.

Por ello, a fin de estudiar las variaciones genéticas CYP2D6 y su dependencia con la edad, consideramos que el tamaño muestral debía ser calculado previamente

⁹⁹ El fenotipo metabolizador de los alelos del gen CYP2D6 ha sido definido internacionalmente como la relación entre la concentración de un fármaco sonda específico de la enzima del gen en cuestión, como la debrisoquina, y la concentración del metabolito principal en un momento específico. Más de 100 polimorfismos han sido identificados ⁽⁴⁶⁾.

en base al número real de mujeres entre 15 y >75 años censadas según bases de datos de demografía y población del INE ^{rr}, y así fuera estadísticamente representativo para poder extrapolar los resultados obtenidos a nuestra población asistencial femenina. El tamaño muestral calculado ($n = 423$) no encontró reflejo en ninguno de los trabajos en población caucásica europea contrastados por el Consorcio Europeo del CYP450 ⁽⁴⁶⁾ y referenciados en el Anexo IX; todos ellos presentaban un tamaño muestral muy inferior al nuestro.

Este subgrupo fue obtenido mediante una cuidadosa selección de muestras de sangre anonimizadas, basándonos en un diseño de muestreo aleatorio, estratificadas en grupos de edad según publica la IACR ^{ss} en relación a la incidencia de cáncer de mama en España y luego, seleccionadas al azar. Ello permitió que dicha población de referencia fuese una representación óptima en los resultados genéticos CYP2D6, tanto de mujeres premenopáusicas como postmenopáusicas, con igual oportunidad de haber sido seleccionadas.

Prueba de ello, se refleja en el estadístico descriptivo bisagras de Turquía; un 50% de nuestra población de referencia tenía una edad comprendida entre los 30 y 60 años. Este rango de edad recoge todos los estadios del climaterio, premenopáusicas, menopáusicas, así como menopáusicas tempranas y tardías, en los que se prescribe el tamoxifeno ⁽²⁸⁾ como fármaco de elección en el tratamiento de cáncer de mama hormonodependiente ^{tt}.

^{rr} INE (Instituto Nacional de Estadística). www.ine.es

^{ss} IACR (International Association of Cancer Registries) www.iacr.com.fr. Dirige el proyecto GLOBOCAN <http://globocan.iarc.fr>, cuyo objetivo es estimar la incidencia, la mortalidad y la prevalencia de 28 tipos de cáncer en 184 países del mundo. La última aportación fue presentada en el año 2012.

^{tt} En el año 1992 se inició el primer ensayo clínico controlado, randomizado con placebo, para evaluar el valor del tamoxifeno como fármaco preventivo. Un total de 13.800 mujeres de alto riesgo pre y postmenopáusicas se ofrecieron voluntarias para el ensayo. La

Por otro lado, la distribución normal según el test de Kolmogorov-Smirnov con una media de 45 años y una baja curtosis, refleja que las frecuencias de edades eran muy similares en todo su rango; es decir, entre 15 y 87 años, por lo que este subgrupo de referencia fue una representación muestral continua homogénea, que se ajustó al objetivo de nuestra investigación, además de cubrir un amplio espectro de edades permitiéndonos extrapolar los resultados CYP2D6 a una población mayor polimedicada en investigaciones futuras. A este respecto, resaltar el trabajo de Sachse ⁽⁴⁴⁾ ya que estudia 330 voluntarios sanos de ambos sexos, donde la edad media de la mujer es de 48 años en un rango de 21 a 91 años; datos estos últimos que encuentran reflejo en los obtenidos para nuestro subgrupo de mujeres de la Comunidad Autónoma de Madrid.

7.2 DISCUSIÓN SOBRE LA TECNOLOGÍA APORTADA

Hemos puesto a punto un método analítico PCR-ARMS que nos permite identificar los polimorfismos CYP2D6*3, *4, *5 y *6 con fenotipo metabolizador pobre, así como CYP2D6*9, *10 y *41 como metabolizadores intermedios. La evidencia de los resultados obtenidos, que más adelante se pondrán en discusión, nos demostró que este test tiene una gran validez analítica, si bien su aplicación en la práctica clínica puede estar limitada debido a su complejidad y difícil automatización.

Recordemos que nuestro método experimental requiere de la realización de una PCR larga y dos PCR ARMS. La primera de ellas es de obligada realización,

incidencia de cáncer de mama se redujo en un 50% en aquellas mujeres tratadas con tamoxifeno en comparación con los controles tratados con placebo ⁽²⁸⁾.

En 1998, la FDA aprobó el tamoxifeno para la reducción del riesgo de cáncer de mama en mujeres pre y postmenopáusicas. Ensayos clínicos posteriores confirmaron que la terapia con tamoxifeno como adyuvante a largo plazo, dirigido a pacientes con cáncer de mama receptores estrogénicos positivos, disminuía significativamente la tasa de mortalidad por la enfermedad ⁽¹⁵⁹⁾. Este antiestrógeno tiene un índice terapéutico favorable y ha mejorado claramente la supervivencia libre de recaídas ⁽¹⁶²⁾. En general, podemos decir que el tamoxifeno ha mejorado el pronóstico de millones de mujeres.

independientemente del método. Amplifica específicamente el gen CYP2D6 y evita la coamplificación de los pseudogenes CYP2D7 y CYP2D8 ^{uu} no funcionales, genéticamente muy similares al gen CYP2D6. Según trabajo de Kimura y col. ⁽³⁷⁾ la secuencia del gen CYP2D6 presenta con respecto a los pseudogenes CYP2D7 y CYP2D8, una similitud en su secuencia exónica del 97% y 92%, respectivamente. Además, sabemos gracias al Proyecto del Genoma Humano ⁽¹⁹⁷⁾ y a las secuencias genéticas recogidas en el Proyecto NCBI RefSeqGene ^{vv} que los polimorfismos CYP2D6*10 (rs1065852), *6 (rs5030655), *4 (rs3892097), *3 (rs35742686), *9 (rs5030656) están localizados en las regiones codificantes de los exones 1, 3, 4 y 5. Así pues, esta elevada similitud en la zona de estudio puede producir durante el análisis genético de los polimorfismos, un anillamiento inadecuado de nuestros primers, tanto a nivel del gen CYP2D6 como de los pseudogenes CYP2D7 y CYP2D8, dando lugar a resultados al menos cuestionables.

Entendemos con ello que la PCR larga de este método no debería considerarse como una complejidad diferenciadora con respecto a otros, aunque los análisis de polimorfismos se analizaran en un autoanalizador, ya que la PCR larga siempre deberá realizarse si queremos tener una mínima garantía en los resultados. El trabajo de Pindurová ⁽²⁰⁰⁾ es un ejemplo claro de esta matización, en el que se combina PCR larga y automatización. Mediante análisis de curvas de fusión en un analizador LightCycler® 480 System de la empresa Roche detectan varios polimorfismos; no

^{uu} Los pseudogenes CYP2D7 y CYP2D8 no son funcionales, pero tienen una homología estructural polimórfica similar con respecto al gen CYP2D6. Por ello, la utilización de dos primers próximos al gen CYP2D6 nos previene de la amplificación de los propios pseudogenes y, en consecuencia, evita falsas interpretaciones ⁽⁵¹⁾.

^{vv} NCBI (National Center for Biotechnology Information) es una división de la US National Library of Medicine, que proporciona un acceso a bases de datos biomédicas. RefSeqGene define secuencias genómicas para ser utilizadas como patrones de referencia para genes bien caracterizados. Estas secuencias, etiquetadas con la palabra clave RefSeqGene en la base de datos de nucleótidos del NCBI, sirven para informar mutaciones, numerar exones e intrones y otras variaciones. Su URL es www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/rsg

obstante, amplifican el gen CYP2D6 previamente, a fin de prevenir amplificaciones no específicas de los pseudogenes CYP2D7 y CYP2D8.

Así pues, a modo de aclaración, cuando hemos puntualizado anteriormente la limitación de nuestro método debida a su complejidad y difícil automatización en la práctica clínica, nos queremos referir principalmente a las dos PCR ARMS multiplex, las cuales son obligadas para una amplificación selectiva de los polimorfismos CYP2D6 a partir del producto resultante de la PCR larga y en combinación de 16 primers. Paso este último que encuentra reflejo en los trabajos de Roberts ^(40, 198), así como en los de otros autores ^(199, 201).

No obstante, a pesar de su laboriosidad y difícil automatización, reconocemos su relevancia por tener la cualidad de analizar en batería los polimorfismos CYP2D6 de baja actividad metabólica con mayor penetrancia en la población caucásica europea, los cuales representan entre el 98% y 70-80% de todos los metabolizadores pobres e intermedios, respectivamente ^(2,39,49,50).

Ahora bien, esta cualidad supone otra complejidad, aunque no en el método sino en su interpretación. La penetrancia y combinación alélica de estos siete alelos polimórficos CYP2D6*3, *4, *5, *6, *9, *10 y *41 en cada locus, dificulta la clasificación fenotípica del paciente en metabolizador pobre, intermedio o extensivo. A medida que se analiza un mayor número de alelos polimórficos, las combinaciones alélicas posibles aumentan exponencialmente y, en consecuencia, las posibilidades de detectar metabolizadores intermedios y pobres aumenta, no por la cantidad de alelos analizados sino por la combinación de los mismos. Por ello, es crucial estudiar nuestra población de referencia para definir el tipo y número de alelos a analizar en función de su frecuencia poblacional, teniendo en cuenta que pueden existir polimorfismos poco frecuentes no estudiados en nuestro método y que serán informados como alelo normal o extensivo *1.

Entendemos con todo ello, que este método tiene una validez analítica, pero no una validez clínica por sí solo, ya que la identificación del genotipo no se relaciona directamente con el metabolismo del medicamento en cuestión. Los fenotipos metabólicos para el tamoxifeno pueden cambiar en función de la combinación alélica. Sin embargo, desde un punto de vista pragmático, esta prueba tiene una gran importancia clínica si su información genética se puede combinar con el análisis cuantitativo de los metabolitos activos del tamoxifeno, tal y como se discutirá más adelante en base a los resultados obtenidos en pacientes con cáncer de mama. Resultados que demostrarán una asociación genotipo-fenotipo y sus posibles efectos secundarios, llegando a la conclusión de que ambos análisis, genético y farmacológico, tiene una gran validez analítica y clínica, ya que diferiría el beneficio de la prueba en la elección posterior de las terapias y la atención de las pacientes con cáncer de mama en tratamiento con tamoxifeno.

Hasta la fecha, la mayoría de estas pruebas genéticas han sido diseñadas a medida para proyectos de investigación, tal es el caso en los trabajos de Sachse ⁽⁴⁴⁾ y Menoyo ⁽⁵²⁾ quienes desarrollaron un método de PCR-RFLP con enzimas de restricción; en los trabajos de Roberts ^(40, 198) o en los nuestros propios con una metodología PCR-ARMS. No obstante, existen metodologías cada vez más automatizadas que buscan una mayor rapidez, como es el caso del AmpliChip ^(203, 204). Compañeros de nuestro propio equipo de investigación ^(56, 132, 189) trabajaron con microarrays Amplichip CYP450 ^{ww} en un analizador Affymetrix GeneChip Scanner

^{ww} Esta metodología automatizada era muy delicada y requería una manipulación excesivamente compleja para su utilización en el laboratorio clínico. En primer lugar, el ADN extraído debía disponer de unas calidades de pureza máximas y su concentración debía estar ajustada entre 2-20ng/μL para poder llevar a término la pre-amplificación del gen CYP2D6. Este segundo paso se realizaba en un termociclador mediante dos mix de primers, que amplificaban por un lado la región promotora hasta el intrón 2 en un fragmento de 2.8Kb, y por otro lado, amplificaba desde el final del intrón 2 hasta el final del gen CYP2D6 en un fragmento de 3.2Kb. Proceso de amplificación que duraba 3 horas y 20 minutos.

3000Dx, que en aquel momento fue el primer test farmacogenético aprobado en EE. UU. y la U.E. al demostrarse su elevado valor analítico ^{xx}, aunque no clínico por las mismas razones antes expuestas. No llegando a extenderse en los laboratorios clínicos, entre otras razones, por su falta de evidencia, su elevada complejidad y su elevado coste ⁽²⁰²⁾.

Otros autores ⁽²⁰⁰⁾, e incluso nosotros mismos en este trabajo de tesis doctoral, estudiamos otra metodología comercialmente disponible. Nos referimos a los kits LightMix® en un autoanalizador LightCycler® 480 Instrument II de la empresa Roche^{yy}. Tecnología que gran interés por permitir una clasificación del diplotipo en

Un tercer paso consistía en fragmentar el producto de la pre-amplificación mediante la enzima DNasa I, a fin de obtener fragmentos de un tamaño aproximado de 50-200 nucleótidos. Paso que duraba unos 35 minutos. Una vez completada la fragmentación, en un cuarto paso se procedía en un termociclador a un marcaje con biotina en el extremo 3' usando una transferasa terminal, a fin de detectar los amplicones hibridados; paso que duraba otros 35 minutos.

Un quinto paso consistía en desnaturalizar las dobles cadenas de ADN marcadas con biotina a 95°C durante 10min, e hibridar con un conjugado de Estreptavidina y R-Ficoeritrina en una estación de fluidos GeneChip 450Dx, el cual a su vez dispensaba las muestras en cada uno de los pocillos del microarray CYP450, en los que el fabricante había fijado los primers para identificar un total de 33 alelos.

Finalmente, este micraarray era leído en un escáner autocargador de GeneChip. Mediante un software bioinformático de análisis de datos, se interpretaba las fluorescencias de cada uno de los pocillos del microarray CYP450. Un informe de la muestra problema era emitido indicando su genotipo y su actividad fenotípica predicha en la comunidad científica y no específica para el metabolismo del tamoxifeno; es decir, no consideraba las combinaciones alélicas con respecto a los niveles de fármaco.

^{xx} US Food and Drug Administration. 510(k) Substantial equivalence determination decisión summary. 2004. URL: www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K043576.pdf

^{yy} El sistema LightCycler® 480 es un termociclador con el bloque de tiempo real incorporado. Permite amplificar y detectar fragmentos diana de ADN mediante la adición de sondas específicas marcadas con fluorescencia (por ejemplo, HybProbe sondas y sondas de hidrólisis), o de oligonucleótidos de secuencia específica marcados con fluoróforos (p.e. SYBR Green I). La posibilidad de combinar libremente cinco filtros de excitación y seis de emisión, permite el análisis de señales de múltiples colorantes en los ensayos de PCR múltiplex. Además, dispone del método "Melting Curve Genotyping", que se utiliza para la caracterización del producto de PCR o la detección de mutaciones SNP (polimorfismos de un solo nucleótido). Este método se basa en el hecho de que cada fragmento de doble cadena de ADN tiene su temperatura de fusión, definida como aquella en la que coexiste un 50% en doble hebra y otro 50% en monohebra. Característica térmica que está definida por la longitud y contenido de guaninas y citosinas de la hebra de ADN.

Actualmente, la empresa Roche comercializa kits LightMix® sólo para aquellos alelos no funcionales que han sido identificados en la mitad de la población caucasiana. Entre ellos, mencionar los alelos *3, *4 y delección alelo *5 homocigoto (Cat. No. 40-0305-32).

heterocigoto u homocigoto. No obstante, los kits comerciales actuales, a diferencia de nuestro método PCR ARMS, sólo permitían analizar los alelos *3, *4 y *5 en un mismo proceso. Limitación que, aún reconociendo la ventaja de su automatización, condicionaba aún más su validez clínica. Su eficacia era menor sólo por el hecho de detectar un número menor de combinaciones alélicas con baja actividad metabólica.

Evidentemente, a mayor número de alelos CYP2D6 analizados mayor será nuestra eficiencia clínica, al producirse una mayor sensibilidad y especificidad ^{zz}, y mejor será la clasificación fenotípica del paciente. No obstante, dado el elevado número de alelos CYP2D6, más de cien ⁽⁴⁶⁾, difícilmente permite estudiarlos en su conjunto en el laboratorio e informarlos al oncólogo clínico. Por ello, un análisis genético exploratorio de sólo aquellos alelos polimórficos CYP2D6 con mayor penetrancia en la población asistencial y baja actividad metabólica, puede ayudar a resolver esta controversia.

Además, a nuestro juicio, se requeriría realizar estudios de coste efectividad. La prueba farmacogenética, en sí misma, supone un coste reducido y no debería ser

El genotipo CYP2D6*3 evidencia la mutación 2637delA en el exón 5. Un fragmento de 317pb que cubre el exón 5, es amplificado y analizado con un oligómero Simpleprobe® en el canal de 530nm, con una temperatura de fusión de 61.3°C para el alelo salvaje y 55.8°C para la delección 2637delA.

El genotipo CYP2D6*4 evidencia una substitución de la base G1934A. Un fragmento de 336pb de la zona de unión entre el intrón 3 y el exón 4, es amplificado y detectado con una sonda de hibridación marcada con Red 640. El genotipo es identificado con un punto de fusión de 56.5°C para el salvaje y de 65.5°C para el mutado 1934A.

La delección CYP2D6*5 no produce ninguna señal en los canales 530 y 640nm. Para demostrar la presencia de ADN amplificado, un fragmento de 234pb del receptor hCR5 es coamplificado y detectado en el canal 705 con sondas de hibridación marcadas con LightCycler Red 690. Exhibe un pico de fusión a 47°C.

^{zz} En el caso del análisis de los polimorfismos CYP2D6 se requiere una correcta determinación de los alelos y una correcta diferenciación de los individuos por su polimorfismo de baja actividad metabólica. Una tabla de doble entrada permite calcular la sensibilidad definida como el porcentaje de polimorfismos CYP2D6 metabolizadores deficientes correctamente asignados. La especificidad se define como el porcentaje de negativos reales correctamente asignados. Nuestra eficiencia será óptima cuando el número de aciertos respecto a casos totales sea del 100%; así pues, cuantos más alelos CYP2D6 de baja actividad se analicen mayor será nuestra eficiencia.

un problema. Ahora bien, su incorporación en la atención de la paciente debería ser antes debatida en el sentido de definir qué análisis deben realizarse en base a la validez clínica aportada. A este respecto, referirnos al trabajo de Schroth ⁽²⁰⁵⁾ por su apreciación en la importancia de aumentar el número de alelos a analizar para clasificar con precisión a los pacientes. A partir de un trabajo sobre pacientes en los que se había analizado sólo el alelo *4, Schroth ⁽²⁰⁵⁾ observó que, si analizaban además los alelos *3 y *5 aumentaba en un 62% el porcentaje de metabolizadores pobres, y en un 100% si se analizaban hasta cinco alelos polimórficos. Así pues, entendemos que lo primero es definir los alelos que deberían ser analizados. A este respecto, podemos decir que existe un consenso en la comunidad científica sobre la obligatoriedad de los análisis genéticos del alelo *4 en la población europea ^(103, 172, 175, 203) y del alelo *10 ^(206, 207, 208) en la población asiática. Sin embargo, los alelos adicionales analizados varían de un estudio a otro dependiendo del tipo de población, dando lugar a fenotipos metabólicos porcentualmente diferentes. Por ello, la importancia de estudiar la penetrancia alélica en nuestra propia población femenina de la Comunidad Autónoma de Madrid y de diseñar un test genético a medida.

Por lo expuesto y dado que, en nuestro modelo de cáncer de mama, existe una falta de evidencia clínica ⁽²⁰⁹⁾ para apoyar el uso rutinario de sólo el genotipado de CYP2D6 para pacientes tratadas con tamoxifeno, nos surgió un interés en analizar además los niveles de tamoxifeno y sus metabolitos.

Hemos podido constatar en un subconjunto de pacientes con cáncer de mama que la metodología HPLC-MS/MS, puesta a punto en nuestro laboratorio, es idónea para la selección y separación efectiva de los metabolitos hidroxilados de tamoxifeno que potencialmente pueden interferir en la clínica del paciente. Metodología que encuentra reflejo en el trabajo de Madlensky ⁽⁶³⁾, así como de

Heath ⁽²¹¹⁾ quien trabaja con un espectrómetro de masas en tándem con trampa de iones, siendo reconocido como un estándar por su elevada sensibilidad.

No olvidemos que la cuantificación analítica es crucial para una buena interpretación de los resultados, y en lo que refiere a los métodos cromatográficos y análisis de tamoxifeno existe mucha diversidad. A este respecto, Teunissen ⁽¹⁸³⁾ refiere en su trabajo una interesante revisión de métodos analíticos utilizados, alguno de ellos en desuso por su falta de fiabilidad, y en el que se resalta la idoneidad de nuestro método cromatográfico.

7.3 DISCUSIÓN SOBRE LOS POLIMORFISMOS DE LA POBLACIÓN DE REFERENCIA

Hemos constado la presencia de cada uno de los polimorfismos CYP2D6*3, *4, *5, *6, *9, *10 y *41, y calculado sus frecuencias alélicas en la población asistencial a partir de un subgrupo de 423 mujeres de la Comunidad Autónoma de Madrid.

Acorde al estadístico de frecuencias de los genotipos CYP2D6 encontrados en la población de referencia, detallados en el capítulo de resultados, se observó que la mayor frecuencia alélica correspondía al alelo nativo CYP2D6*1 con un 77.66%, seguido del alelo *4 con un 13.71%. Los alelos *9, *41, *10 y *3 presentaron frecuencias del 3.19%, 2.60%, 1.54% y 0.83%, respectivamente; frecuencias alélicas de 0.24% correspondieron a los alelos *5 y *6. Datos que se representan en figura 18.

Las edades medias en las que aparecieron los diferentes genotipos polimórficos CYP2D6 indicaban, según el test ANOVA de un factor y una $p=0.276$, que no existía significación estadística inter-grupos genéticos. Además, su agrupación por edades en series de 5 años, entre 15 y más de 75 años, constató que no existía un incremento de polimorfismos con la edad, ni tampoco se producía aumento de los diplotipos polimórficos heterocigotos u homocigotos.

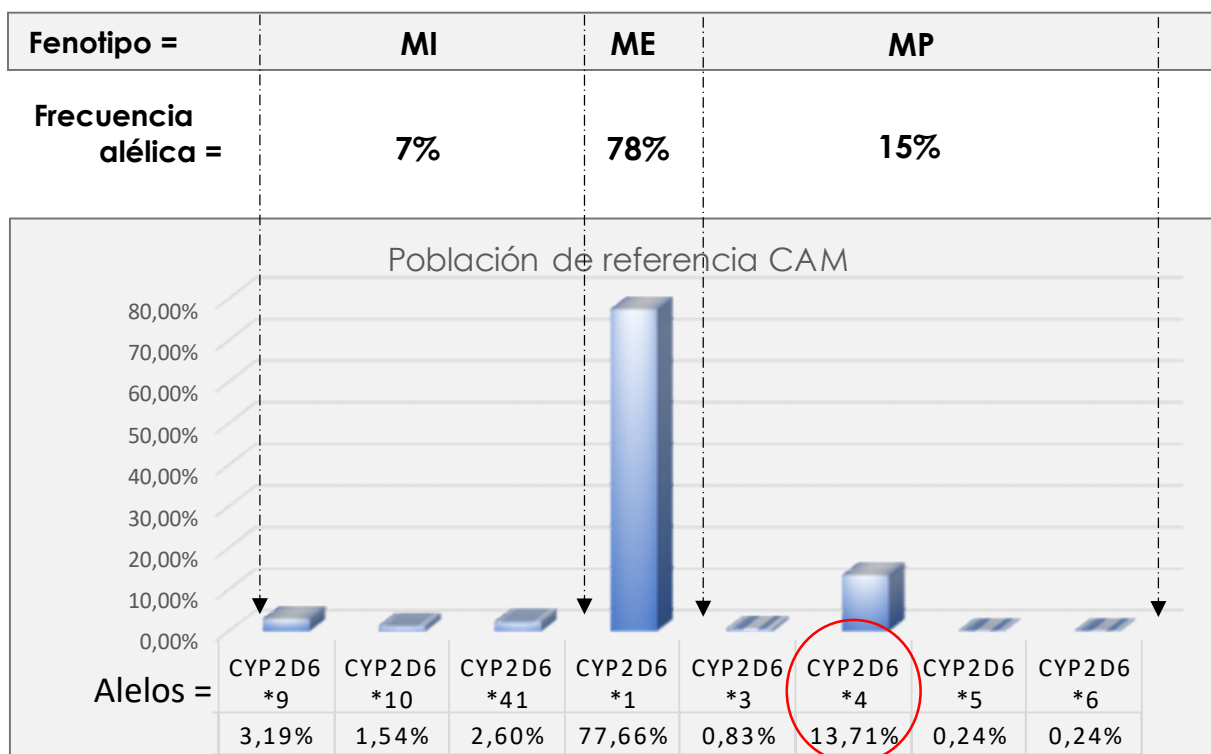


Figura 18. Histograma de las frecuencias alélicas de los polimorfismos CYP2D6 en la población sana de la Comunidad Autónoma de Madrid. La mayor frecuencia alélica polimórfica refiere al CYP2D6*4.

La distribución del genotipo polimórfico más frecuente CYP2D6*4 era, según el test de Kruskal-Wallis y una $p=0,443$, similar entre categorías de rango de edad. Su presencia era mayoritaria en cualquier grupo de edad, y en menor frecuencia de los alelos *9, *10 y *41. Los alelos *3, *5 y *6 eran muy poco frecuentes.

La suma de los cuatro alelos metabólicamente inactivos *3, *4, *5 y *6 suponían el 15.02% de los alelos analizados en el estudio, versus la media del 22,9%^{aaa} reportado en las poblaciones recogidas por el Consorcio Europeo CYP450 y referidas a diferentes nacionalidades de la Unión Europea. Diferencia atribuida mayoritariamente al polimorfismo CYP2D6*4, cuya frecuencia alélica media es del

^{aaa} Valor medio resultante de la suma de las frecuencias medias de los alelos *3 con 1.44%, *4 con 18%, *5 con 2.58% y *6 con 0.91%, publicadas por la comunidad científica⁽⁴⁶⁾.

18% en la población europea ⁽⁴⁶⁾ y del 13,7% en el presente estudio. Mencionar la coincidencia de este último dato, con los publicados por Menoyo y col. ⁽⁵²⁾, quienes encontraron un 13,8% en una población española ubicada en Barcelona, así como por Correia y col. ⁽⁵⁴⁾ con un 13,3% en una población portuguesa o Beer y col. ⁽⁵³⁾ en una población más distante como la austriaca. No obstante, a pesar de esta similitud, existe una amplia variación de las frecuencias alélicas CYP2D6*4 entre nacionalidades europeas, según datos extraídos del Consorcio Europeo CYP2D6 y editados en el anexo IX. Ahora bien, todos sus investigadores coinciden con Anderson y col. ⁽⁴⁸⁾ en cuanto a que el polimorfismo CYP2D6*4 de baja actividad metabólica es el más común en la población caucásica europea. En lo que respecta a los alelos inactivos *3, *5 y *6, todos ellos estaban en rango con los publicados por el Consorcio Europeo CYP450 para la población europea ^{bbb}.

En cuanto a los alelos con actividad metabólica intermedia *9, *10 y *41, representaron una frecuencia alélica del 7,33%, versus la media del 13,94%^{ccc} reportada en las poblaciones europeas, diferencia principalmente definida por la frecuencia poblacional obtenida para el alelo *41. Decir a este respecto que, nuestro valor de 2,60% se encuentra ligeramente por debajo del límite inferior del rango 3.76-14% ⁽⁴⁶⁾ publicado por la comunidad científica y reportado por Fernández-Santander ⁽⁵⁶⁾ a partir de una población española y con una metodología experimental diferente; por lo que podemos decir que es prácticamente coincidente, y refuerza el resultado obtenido mediante nuestra

^{bbb} Los rangos de frecuencias poblacionales europeas son: alelo *3 (0-3.2%), alelo *4 (10-29.10%), alelo *5 (0-5.6%), alelo *6 (0-2.5%), alelo *9 (0-5%), alelo *10 (0,38-14.5%) y alelo 41 (3.76-12,40%) ⁽⁴⁶⁾.

^{ccc} Valor medio resultante de la suma de las frecuencias medias de los alelos *9 con 2.54%, *10 con 3.30% y *41 con 8.10%, publicadas por la comunidad científica y recogidas por el comité internacional europeo de alelos CYP (ver anexo IX).

técnica de genotipado. En lo que respecta a los alelos *9 y *10, ambos se encuentran en rango.

Así pues, podemos concluir que todos nuestros valores estaban en rango con respecto a los mínimos y máximos publicados por el Consorcio Europeo CYP450 ⁽⁴⁶⁾, y en su conjunto, dada la desviación media observada entre los trabajos publicados en el anexo IX, existen ligeras diferencias no significativas en lo que respecta a las frecuencias alélicas de los alelos polimórficos CYP2D6 a través de las diferentes nacionalidades de Europa. Diferencias que casi seguro, dada su baja frecuencia poblacional, se minimizarían aumentando el tamaño muestral. A este respecto, mencionar que nuestro estudio presenta un tamaño muestral muy superior al resto de publicaciones recogidas por el Consorcio Europeo CYP450 y refereridas sólo a población europea.

En base a los datos expuestos, hay que resaltar la suma porcentual de los alelos con actividad pobre (15.02%) e intermedia (7.33%), ya que supuso un total del 22.35% de los alelos de la población de referencia.

ANEXO IX. DISTRIBUCIÓN ALÉLICA CYP2D6 EN POBLACIÓN CAUCÁSICA EUROPEA

Autores	Año	Región	Población	N	*1	*3	*4	*5	*6	*9	*10	*41
Menoyo et al	2006	Europe	Spanish	105	71,47	0,95	13,80	3,33	0,95	2,38	1,90	-
Rasmussen et al	2006	Europe	Danish	225	59,30	3,10	19,10	2,90	1,60	3,60	0,90	6,90
Sistonen et al	2007	Europe	Europeans	157	63,10	0,30	17,20	3,20	0,60	2,50	2,90	7,00
Arvanitidis et al	2007	Europe	Greek	283	72,44	2,30	17,84	-	-	-	-	-
Rasmussen et al	2007	Europe	Danish	244	56,90	1,60	19,70	5,30	1,30	2,90	1,60	9,80
Koseler et al	2007	Europe	Turkish	100	-	-	21,00	-	-	-	-	-
Crescenti et al	2007	Europe	Spanish	290	79,2	0,9	16,5	2,7	0,7	-	-	-
Crescenti et al	2008	Europe	Spanish	188	77	2	19	2	1	-	-	-
Crescenti et al	2008	Europe	Spanish	79	78	1	20	0	2	-	-	-
Myrand et al	2008	Europe	Caucasians	142	70,30	2,10	18,20	1,70	2,10	-	1,40	-
Gjerde et al	2008	Europe	Norwegian	151	74,83	0,33	20,53	2,32	0,33	-	-	-
Buzková	2008	Europe	Czech	223	69,50	1,10	22,90	3,10	0,20	-	-	-
Rebsamen et al	2009	Europe	Swiss	165	51,00	0,60	20,60	2,40	1,20	2,70	2,70	7,30
Correia et al	2009	Europe	Portugese	100	74,60	1,40	13,30	2,80	1,87	-	-	-
Fernandez-Santander et al	2010	Europe	Spanish	104	81,30	0,90	15,90	1,90	0,00	-	-	-
Fernandez-Santander et al	2010	Europe	Spanish	185	78,20	1,60	18,50	1,00	0,50	-	-	-
De Luca et al	2010	Europe	Italian	218	68,60	3,20	17,70	0,00	0,90	-	-	9,50
De Luca et al	2010	Europe	Italian	110	68,30	0,90	16,10	1,80	0,90	-	-	11,90
Vangsted	2010	Europe	Danish	228	70,90	1,30	21,90	3,80	0,60	-	-	-
Zachrisson et al	2010	Europe	Swedish	239	75,10	1,50	16,30	3,60	0,80	-	-	-
Zachrisson et al	2010	Europe	Swedish	254	71,00	3,10	18,50	3,10	0,80	-	-	-
Serin et al	2012	Europe	Turkish	100	69,00	1	10	3	2,5	-	14,5	-
Háber et al	2013	Europe	Hungarians	55	48,20	2,7	29,1	0	1,8	1,8	1,8	6,4
Zafra-Ceres et al	2013	Europe	Spanish	90	55,00	0	18,89	5,6	0	5	3,89	6,11
Fernández_Santander et al	2013	Europe	Spanish	133	75,57	0,75	11,65	3,38	0,38	1,5	0,38	3,76
Zachrisson et al	2010	Europe	Swedish	205	72,20	2,40	19,30	3,90	0,70	-	-	-
Rideg et al	2011	Europe	Hungarian	112	54,90	1,80	20,40	1,80	0,40	1,40	-	8,00
Beer et al	2011	Europe	Austrian	93	63,20	0,50	14,00	1,60	0,50	1,60	4,30	12,40
Sahin et al	2011	Europe	Turkish	249	-	-	12,00	-	-	-	-	-
Slanar et al	2012	Europe	Czech	156	72,40	1,00	20,20	3,50	0,00	-	-	-
Cátedra Complutense de Diagnóstico e Innovación UCM-ROCHE	2018	Europe	Spanish	423	77,66	0,83	13,71	0,24	0,24	3,19	1,54	2,60
				Media	68,63	1,44	18,00	2,58	0,91	2,54	3,30	8,10
				Mín	48,20	0,00	10,00	0,00	0,00	1,40	0,38	3,76
				Máx	81,30	3,20	29,10	5,60	2,50	5,00	14,50	12,40

Porcentaje nada despreciable, si pensamos que está asociado al metabolismo farmacológico del tamoxifeno ^{ddd} y ello, sin duda alguna, tendrá una gran relevancia clínica para el tratamiento del cáncer de mama hormonodependiente.

Goetz y Schroth ^(97, 98) hablan de variantes genéticas causantes de una actividad enzimática CYP2D6 deficitaria y lo asocian con un tiempo de recaída más corto (RFT, relapse free time); y Saladores ⁽⁶⁵⁾ realza la importancia de los niveles del tamoxifeno y sus metabolitos con respecto a la supervivencia libre de recaídas (DRFS) ⁽⁶⁵⁾.

En esta línea, mencionar otro trabajo de Schroth ⁽¹⁷⁵⁾ en el que realiza un estudio longitudinal, con una media de seguimiento de 71 meses, en pacientes con cáncer de mama MP CYP2D6*4 y *5, así como MI CYP2D6*10 y *41, concluyendo que existía un tiempo libre de recaídas menor, es decir, tenían peor pronóstico.

Ahora bien, los trabajos de Rae ⁽⁹⁹⁾ y Regan ⁽¹⁰⁰⁾ presentan resultados contradictorios, donde no hay una clara relación del fenotipo CYP2D6 y los resultados terapéuticos observados. Una literatura controvertida que, cuestiona la

^{ddd} En 1997, Crewe ⁽⁹¹⁾ hizo mención a múltiples isoformas CYP del hígado humano (CYP3A, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2B6, y CYP1A2) como enzimas que podían estar implicadas en la biotransformación del tamoxifeno en sus metabolitos primarios; sin embargo, los efectos de las variantes alélicas de los genes que codificaban dichas enzimas permanecían desconocidos.

No sería hasta septiembre de 2004, cuando Desta ⁽⁹²⁾ descubrieran que la enzima producida por el gen CYP2D6 metabolizaba el tamoxifeno en sus metabolitos 4-hidroxitamoxifeno y endoxifeno.

El gen CYP2D6 despertó un gran interés entre los investigadores, no sólo en la metabolización del tamoxifeno sino también en la de otros muchos medicamentos.

En 2005, Andersson ⁽⁴⁸⁾ atribuía a la variación genética como responsable de la variabilidad interindividual en la hormonoterapia con tamoxifeno en cáncer de mama receptores estrogénicos positivos.

Así pues, está ampliamente constatado en la comunidad científica que el gen CYP2D6 está implicado en la biotransformación del tamoxifeno. Incluso sabemos desde hace tiempo que las mujeres con tratamiento adyuvante con tamoxifeno, tenían un riesgo más elevado de recurrencia de cáncer de mama ⁽¹³⁶⁾ y una incidencia más baja de sofocos cuando ellas eran portadoras del genotipo CYP2D6*4 con actividad metabólica pobre ⁽⁹⁷⁾.

Los factores genéticos del CYP2D6 son evidentes, aquellas mujeres con variantes que afecten a la funcionalidad de la enzima no tendrán el mismo éxito que una paciente con un buen resultado en la misma terapia. Por ello el interés de estudiar también las variantes genéticas tipificadas como metabolizadores intermedios.

eficacia clínica de los polimorfismos CYP2D6 como indicadores para predecir los resultados terapéuticos con tamoxifeno. Por ello, se decidió estudiar no sólo las variantes genéticas CYP2D6 con un impacto significativo sobre la eficacia metabólica, sino también las concentraciones de tamoxifeno y sus metabolitos en una población enferma.

7.4 DISCUSIÓN SOBRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA POBLACIÓN ENFERMA

Hemos constatado la importancia de los polimorfismos CYP2D6 en relación con el metabolismo del fármaco, en un estudio sobre un total de 100 casos clínicos de pacientes diagnosticadas de cáncer de mama receptores estrogénicos positivos en tratamiento con tamoxifeno, en las que se había realizado un análisis genético y otro metabólico.

El modelo que hemos estudiado, y que relaciona polimorfismos y niveles de tamoxifeno encuentra reflejo en los trabajos de Madlensky ^(63, 216) y Saladores ⁽⁶⁵⁾, si bien éstos realizan un análisis longitudinal retrospectivo sobre los niveles de tamoxifeno según polimorfismos CYP2D6 y su habilidad para predecir la recurrencia de cáncer de mama, mientras que en nuestro caso hicimos un estudio transversal constatando la relación metabólica entre polimorfismos CYP2D6 de baja actividad metabólica y niveles de endoxifeno en una población enferma, lo que permite enfatizar la combinación del análisis de endoxifeno y el análisis genético como información a aportar al oncólogo clínico a fin de tener una evolución clínico-terapéutica más adecuada.

Sobre una selección de 65 casos de pacientes enfermas, genotípicamente coincidentes con los obtenidos en nuestra población de referencia, polimorfismos CYP2D6*1, *3, *4, *5, *6, *9, *10 y *41, se encontró una frecuencia alélica del 80%, 0.76%, 13.07%, 1.53%, 0.76%, 0.76%, 0.76% y 2.30%, respectivamente (figura 19).

Valores muy parecidos a los obtenidos en nuestra población caucásica de referencia (figura 10), lo que nos reafirmó en los resultados obtenidos con el método utilizado en esta tesis doctoral.

Respecto a las frecuencias poblacionales obtenidas, hay que resaltar el trabajo de Hanioka y col. ⁽¹⁸⁴⁾ por sus estimaciones sobre el alelo CYP2D6*4. Éste tenía una frecuencia poblacional dependiente según el grupo poblacional, siendo en caucásicos del 12-23%, en africanos negros del 1,2-7% y en asiáticos entre 0-2,8%. Estimación en caucásicos que engloba nuestro porcentaje, y justifica la correcta selección de nuestra población caucásica.

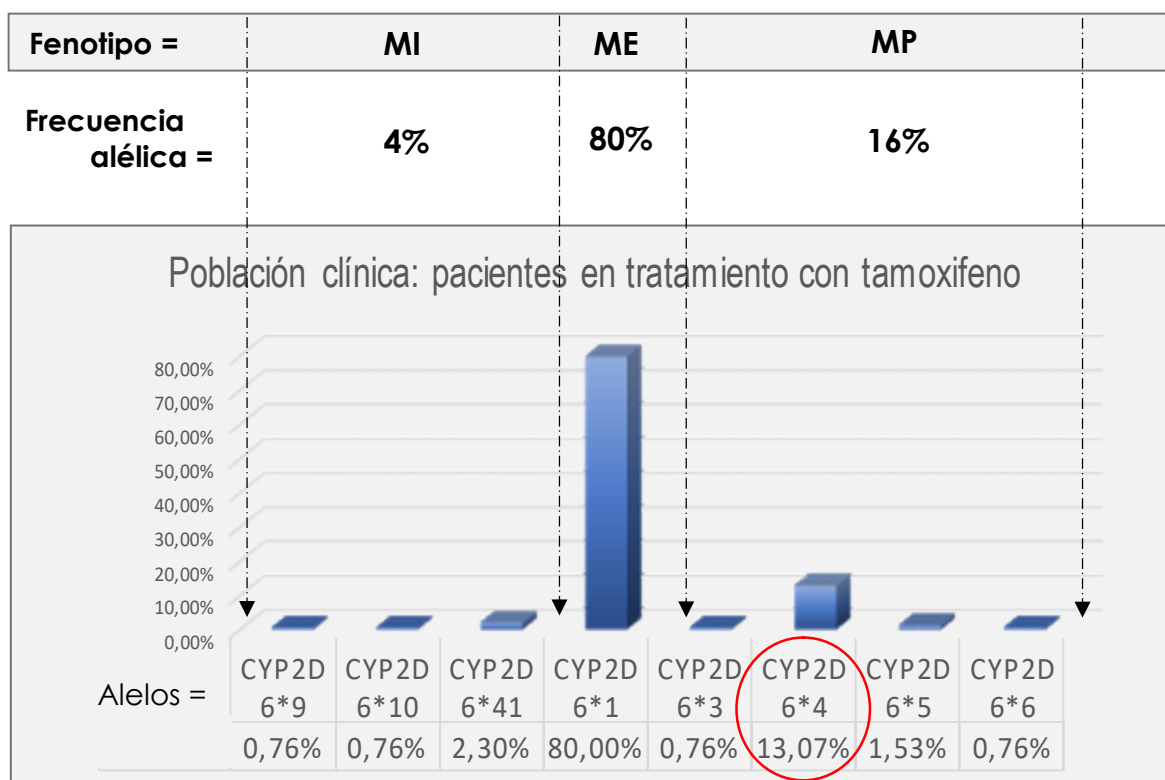


Figura 19. Histograma de las frecuencias alélicas de los polimorfismos CYP2D6 en pacientes con cáncer de mama en tratamiento con tamoxifeno. La mayor frecuencia alélica polimórfica refiere al CYP2D6*4. Los valores son muy similares a los obtenidos en la población sana de referencia.

Esta selección genotípica nos permitió a su vez estudiar su fenotipo metabólico para el tamoxifeno y sus metabolitos. No olvidemos que este fármaco, con más de 40 años de experiencia, aún habiendo sido ampliamente utilizado durante más de 25 años para el tratamiento de todos los estados del cáncer de mama RE positivos, incluso para la prevención en mujeres con un alto riesgo de desarrollar la enfermedad ⁽²⁸⁾, presenta una eficacia clínica y toxicidad significativamente variantes entre pacientes ⁽¹⁸⁵⁾.

Los primeros intentos para vincular una respuesta clínica a la terapia con tamoxifeno considerando sólo las concentraciones de la molécula madre en sangre, no revelaron diferencias significativas entre pacientes que recibieron 10mg y 20mg diarios ⁽¹⁸⁶⁾. Esta no diferenciación entre dosis evidenció que la monitorización del tamoxifeno como tal no podía ser pronóstico de su eficacia clínica, más cuando ya se sabía que no era una molécula activa ⁽¹⁸⁷⁾. Observación que ha quedado claramente manifiesta en el estudio con pacientes realizado sobre los genotipos CYP2D6*1, *3, *4, *5, *6, *9, *10 y *41. El test no paramétrico de Kruskal-Wallis para una significancia $p < 0,05$, confirmó estadísticamente que no existían diferencias metabólicas del tamoxifeno inter-grupos de polimorfismos CYP2D6 ($p = 0,099$).

Esta falta de asociación entre el genotipo CYP2D6 y niveles de tamoxifeno, nos llevó a descartar, en un principio, las concentraciones de la molécula madre como marcador de interés en la respuesta al tratamiento; sin embargo, se planteó como punto de discusión si este dato podría ayudar al clínico como indicador del cumplimiento terapéutico.

Según Saladores ⁽⁶⁵⁾ parece ser que sí. Clasificaron a las pacientes en dos divisiones de incumplimiento del tratamiento en función de la concentración de tamoxifeno. Valores extremos, fuera de los percentiles 5% y 95%, indicaban que la paciente no seguía el tratamiento de manera adecuada. Así pues, establecieron que

niveles comprendidos entre 40-150nM cumplían con el tratamiento moderadamente, y niveles inferiores a 40nM incumplían el tratamiento. Este trabajo es muy interesante, y refuerza la cuestión de si el clínico debería solicitar los niveles de tamoxifeno en un informe farmacogenético para alcanzar su objetivo.

En nuestro caso, podemos decir que aún siendo pocos y puntuales los datos analizados, y no pudiendo monitorizar a la paciente en el transcurso del tiempo, se observa que todas ellas cumplían el tratamiento óptimamente al presentar niveles superiores a 1,74 (150nM ó 55ng/mL)^{eee}. No obstante, se observó que el genotipo CYP2D6*4/*41 presentó una concentración logarítmica media de 1,90 para la molécula de tamoxifeno; valor por debajo del rango de normalidad calculado para el gen nativo CYP2D6*1 comprendido entre 1,98 y 2,55 (ver capítulo resultados).

Así mismo, se observó que la concentración de 4-hidroxi-tamoxifeno, metabolito primario de la vía secundaria de la Fase I, presentaba niveles próximos a cero. Todo ello nos hace pensar que la paciente no cumplía con el tratamiento, y coincidiendo con Saladores ⁽⁶⁵⁾, el nivel de tamoxifeno podría ser un indicador del cumplimiento del tratamiento.

En lo que concierne a los metabolitos hidroxilados del tamoxifeno, su actividad antiestrogénica fue referida en múltiples publicaciones a finales de la década de los setenta principios de los ochenta ^(30, 84, 85); aunque poco se conocía sobre su biotransformación. Se sabía que el metabolito primario 4-hidroxi-tamoxifeno era cien veces más potente ⁽³⁰⁾ que el tamoxifeno e igual de potente que el otro metabolito primario N-desmetil-tamoxifeno ⁽⁸⁶⁾, aunque éste último presentaba mayor abundancia en pacientes en tratamiento con tamoxifeno ⁽⁸⁷⁾. En referencia al 4-hidroxi-N-desmetil-tamoxifeno o endoxifeno ^(89, 90), resultante de la metabolización final, presentaba mayor concentración ⁽⁸⁸⁾ e igual eficacia que el 4-hidroxi-

^{eee} Cálculo realizado considerando un peso molecular para el tamoxifeno igual a 371,521.

tamoxifeno ⁽⁸⁷⁾. Conclusiones cuantitativas que han podido ser verificadas en los estadísticos descriptivos (ver anexo VII) obtenidos para el grupo nativo CYP2D6*1, secuenciado por Kimura ⁽³⁷⁾.

Ring ⁽⁹³⁾, en diciembre de 2004, justificaba la variación entre las pacientes en tratamiento con tamoxifeno, por una bioactivación alterada de la molécula madre en endoxifeno, bien por factores genéticos bien por factores ambientales. Estudios más recientes, en pacientes postmenopáusicas y premenopáusicas con tamoxifeno como fármaco adyuvante, indican que la variación observada está influenciada por el fenotipo metabolizador CYP2D6, el cual puede ser predicho por una prueba genética ⁽⁷²⁻⁷⁴⁾.

No obstante, se debate sobre la falta de asociación del gen CYP2D6 con los resultados clínicos en algunos estudios ^(59, 60, 61, 94, 95, 96) apuntando a la necesidad de combinar análisis genéticos con farmacocinéticos.

En esta línea, varios investigadores ^(63,65, 83) han relacionado un decrecimiento de la actividad CYP2D6 con un nivel bajo de endoxifeno y un mal pronóstico. Todo apunta a que el genotipado del CYP2D6, por sí solo, no es suficiente para predecir una respuesta terapéutica, requiriéndose de la monitorización del endoxifeno; ambos datos son probablemente las mejores aproximaciones para personalizar la terapia con tamoxifeno, al entender que todos los factores implicados en la generación y eliminación del endoxifeno estarían considerados en su cuantificación.

En nuestro caso, se ha podido observar a partir de los 65 casos clínicos agrupados según fuesen CYP2D6*1, *3, *4, *5, *6, *9, *10 y *41, una actividad metabólica significativamente disminuida para endoxifeno con respecto al gen normal CYP2D6*1, según se extrae de la figura 20 y se confirma mediante el test de Kruskal-Wallis para una significancia $p < 0,05$.

Además, existe una relación inversa entre endoxifeno y el cociente N-desmetil-tamoxifeno/endoxifeno, dependiente del nº y combinación de alelos polimórficos CYP2D6.

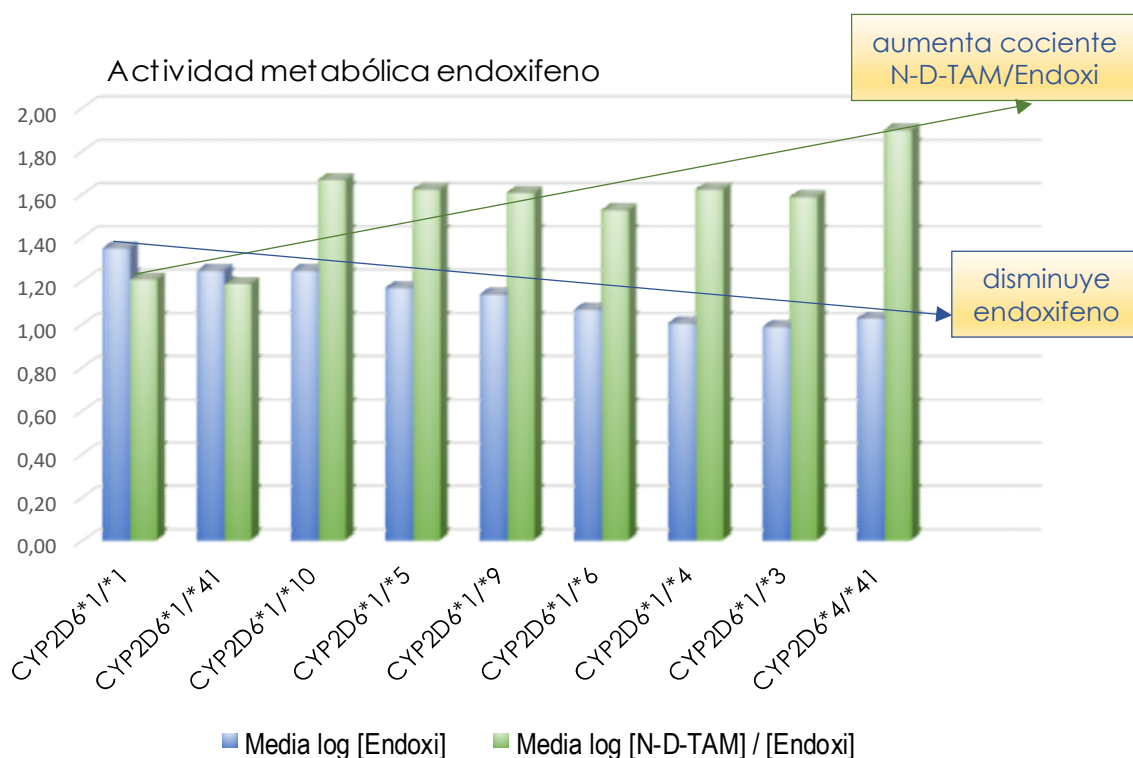


Figura 20. Histograma de los niveles de endoxifeno y el cociente N-desmetil-tamoxifeno/endoxifeno con respecto a los diferentes polimorfismos alélicos CYP2D6. Se observa una relación inversa; dependiente del número y combinación de alelos polimórficos.

Disminución coincidente con las observaciones de otros investigadores ^(63,65), sugiriendo una conexión entre el genotipo CYP2D6 con una actividad metabólica reducida y una concentración deficiente de endoxifeno. Vínculo que puede repercutir en la respuesta al tratamiento, tal y como se ha expuesto anteriormente, más cuando de los metabolitos activos, el endoxifeno es el que mayor afinidad tiene por los receptores estrogénicos y el que mayor actividad antiestrogénica

presenta, comportándose como citostático cuando las células tumorales se encuentran en la fase G-2 del ciclo de división celular.

7.5 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CON LA LITERATURA CIENTÍFICA

Hemos constatado que existen razones metabólicas o moleculares para relacionar el tamoxifeno con el genotipo CYP2D6. Ahora bien, por el tipo de estudio transversal realizado, esta relación genotipo-fenotipo no nos permite estudiar su habilidad para predecir el tiempo libre de recaídas tras años de tratamiento, si bien podemos compararla con la literatura científica.

Madlensky y col. ⁽⁶³⁾ en 2011, publicaron por primera vez la relación entre polimorfismos CYP2D6, concentraciones de endoxifeno y resultados de cáncer de mama, sugiriendo una probable relación dosis-respuesta no lineal para el efecto del tamoxifeno. Esta vinculación clínica asoció un 26% más de recidivas en pacientes con concentraciones de endoxifeno inferiores a 0,77 (15.8nM ó 5,9ng/mL), tanto en mujeres premenopáusicas como postmenopáusicas. Posteriormente, Teft y col. ⁽⁸³⁾ establecieron un valor de 0,83 (18nM ó 6.7ng/mL) de endoxifeno, por debajo del cual se determinaba una terapia sub-óptima con tamoxifeno. Ni el tamoxifeno ni otros metabolitos principales estaban asociados con dicho riesgo, excepto el endoxifeno. Consideraciones que Goetz y colaboradores ⁽¹⁹⁶⁾ del CPIC (Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium) consideran en una guía^{fff} de 2018 dirigida a los clínicos para ayudar en la interpretación de los genotipos CYP2D6 en el uso del tamoxifeno.

En línea con estas últimas investigaciones, mencionar de nuevo la publicación de Saladores y col. ⁽⁶⁵⁾ en 2015, quienes tras clasificar las concentraciones de endoxifeno en cuartiles, encontraron que las mujeres agrupadas en el cuartil más

^{fff} Guía que es actualizada periódicamente en www.cpicpgx.org/guidelines/

bajo tenían un riesgo más elevado de obtener malos resultados. Pacientes con concentraciones de endoxifeno inferiores a 0,72 (14,15nM ó 5,28ng/mL), tenían una supervivencia libre de recaídas más corta (DRFS) con respecto a aquellas otras pacientes con niveles superiores a 1,11 (35nM ó 13,07ng/mL). Valor de concentración este último muy interesante, ya que nos acerca al valor óptimo de endoxifeno obtenido en un estudio "in vitro" con células de cáncer de mama MCF7 realizado en 2013 por Gong y col. ⁽¹⁷⁴⁾. Una concentración de 1,27 (53nM ó 19,80 ng/mL) de endoxifeno fue determinada como clínicamente eficaz para producir una óptima supresión del tumor a los niveles de estrógenos presentes en una mujer premenopáusica. Por otro lado, Love y col. ⁽¹⁴⁷⁾ en 2013 estudiaron la relación entre concentración de endoxifeno, genotipos CYP2D6 y la recurrencia de cáncer de mama en un grupo de 48 mujeres asiáticas, sugiriendo que hay un rango óptimo de endoxifeno para alcanzar efectos favorables como terapia adyuvante. Sus datos fueron consistentes con las publicaciones anteriores, no obstante, observaron sorprendentemente que el 25% de las pacientes con niveles de endoxifeno superiores a 1,84 (70ng/mL) presentaban recurrencia de cáncer de mama.

Así pues, en estos últimos años hemos podido disponer de unos valores orientativos asociados con la clínica del paciente que nos sitúan en un punto de discusión muy interesante. Si Madlensky y Teft ^(63, 83) revelan un valor umbral o cut-off límite de endoxifeno para determinar una sub-óptima terapia con tamoxifeno, Saladores ⁽⁶⁵⁾ sugiere niveles superiores a 13,07ng/mL para menor riesgo de recidiva, Gong ⁽¹⁷⁴⁾ recomienda niveles de 19,80ng/mL para una óptima supresión de las células tumorales, y Love ⁽¹⁴⁷⁾ alerta evitar niveles >70ng/mL, la pregunta que nos formulamos es cómo podrían afectar estos datos, los cuales resumimos en la tabla 5, a la hora de interpretar nuestros análisis en un informe farmacogenético.

	Mal pronóstico	Pronóstico moderado	Pronóstico óptimo	Mal pronóstico
Medición endoxifeno	<13ng/mL Log ₁₀ = 1,11	13-19ng/mL Log ₁₀ = 1.11-1.27	>19ng Log ₁₀ = 1.27	>70ng/mL Log ₁₀ = 1.84

Tabla 5. Criterios de interpretación clínica en base a los estudios longitudinales retrospectivos en pacientes con cáncer de mama en tratamiento con tamoxifeno. Pronóstico refiere a supervivencia libre de recaídas (DRFS).

No debemos olvidar que nuestro estudio es transversal, por lo que no se realizó un seguimiento en el tiempo de la paciente como Schroth y col. ⁽¹⁷⁵⁾, careciendo de información clínica de su supervivencia libre de recaídas. No obstante, creemos que los trabajos bibliográficos mencionados, relacionados con los criterios de interpretación clínica, ayudan a establecer hasta qué punto se justifica la indicación del informe farmacogenético.

A este respecto, comentar en primer lugar como punto de discusión que, una vez aplicados los criterios de clasificación sugeridos en la tabla anterior, existe una variabilidad intragrupo a interpretar, confirmándose lo ya comentado anteriormente; es decir, el genotipo CYP2D6 como dato aislado en un informe farmacogenético, no es lo suficientemente definitorio para predecir si la paciente podrá tener una respuesta deseable al tratamiento con tamoxifeno.

Prueba de ello, está en la clasificación del grupo de pacientes CYP2D6*1 metabólicamente normales o extensivos, obtenida en función de los umbrales de otros autores en estudios longitudinales con pacientes crónicas, enfermas de cáncer de mama, y que detallamos en tabla 6.

	Mal pronóstico	Pronóstico moderado	Pronóstico óptimo	Mal pronóstico
Nivel de Endoxifeno	<13ng/mL $\text{Log}_{10} < 1,11$	13-19ng/mL $\text{Log}_{10} = 1.11-1.27$	>19ng $\text{Log}_{10} > 1.27$	>70ng/mL $\text{Log}_{10} > 1.84$
CYP2D6*1/*1	4,87%	26,82%	68,29%	-
CYP2D6*1/3	100%	-	-	-
CYP2D6*1/*4	66,66%	6,66%	26,66%	-
CYP2D6*1/*5	-	100%	-	-
CYP2D6*1/*6	100%	-	-	-
CYP2D6*1/*9	-	100%	-	-
CYP2D6*1/*10	-	100%	-	-
CYP2D6*1/*41	-	100%	-	-
CYP2D6*4/*41	100%	-	-	-

Tabla 6. Interpretación clínica. Porcentaje de pacientes con cáncer de mama en hormoterapia con tamoxifeno que auguran un mal pronóstico según niveles umbral de endoxifeno extraídos de estudios longitudinales. Un 32% de las pacientes enfermas identificadas con el gen nativo CYP2D6*1 metabólicamente normal o extensivo, presentarían niveles bajos de endoxifeno y peor pronóstico, entendiéndose éste como un tiempo de respuesta libre de recaídas más corto. Una supervivencia variable intra-grupo CYP2D6*1 presta a una interpretación simplificada al inicio del tratamiento, por lo que el genotipado CYP2D6 aislado, sólo puede ser predictivo para orientar los análisis cromatográficos del endoxifeno.

Observamos que un 68.29% de los genotipos nativos CYP2D6*1 tendrían un pronóstico óptimo al presentar niveles por encima de los 19ng/mL de endoxifeno, un 26.82% tendrían un pronóstico moderado con niveles entre 13-19ng/mL y un 4.87% un pronóstico malo con niveles inferiores a 13ng/mL. Porcentajes que por sus implicaciones clínicas nos alarman, especialmente cuando los médicos adoptan una interpretación simplificada en sus decisiones iniciales del tratamiento al ver un genotipo nativo CYP2D6*1. Por ello, entendemos que el médico no puede deliberar en base a sólo una prueba de genotipado CYP2D6, ya que existen excepciones en las que no puede predecir si las pacientes podrían llegar a tener concentraciones beneficiosas de endoxifeno.

Ahora bien, visto que un 32% de las pacientes CYP2D6*1 pueden tener niveles de endoxifeno bajos y un mal pronóstico⁹⁹⁹, nos reafirma en que se debe estandarizar la relación genotipo-fenotipo para la asociación entre el polimorfismo CYP2D6 y el metabolismo de tamoxifeno. Ello justifica una cuantificación directa del endoxifeno en su fase estacionaria; es decir, a los cuatro meses después del inicio del tratamiento, a fin de descartar una deficiencia metabólica por causas diferentes al gen nativo CYP2D6*1, como son: el incumplimiento del tratamiento, el consumo de inhibidores de CYP2D6, factores medioambientales que modulan la formación de vitamina D pudiendo disminuir la actividad de la enzima CYP3A4/5 necesaria para la formación del metabolito primario N-desmetil-tamoxifeno ⁽⁸³⁾, y la presencia de otras enzimas no funcionales de genes polimórficos del citocromo P450 implicadas en el metabolismo del tamoxifeno. Fluctuaciones que afectarían en los niveles de los precursores y en la variabilidad del endoxifeno ⁽⁶²⁾, justificándose la necesidad de un informe farmacogenético.

En lo que respecta a los restantes genotipos CYP2D6*3, *4, *5, *6, *9, *10 y *41, observamos que los genotipos con un alelo polimórfico *3 y *6, o con dos alelos polimórficos *4/*41, presentarían en el 100% de los casos un mal pronóstico. Los genotipos con un alelo polimórfico *5, *9, *10 y *41 presentarían en el 100% de los casos un pronóstico moderado. No obstante, referente al gen con un alelo *4, un 26.66% podría presentar un pronóstico óptimo, un 6.66% moderado y un 66.66% muy malo. Variabilidad que de nuevo nos lleva a plantear la necesidad del análisis genético junto con la monitorización del endoxifeno para los genotipos de baja actividad metabólica.

⁹⁹⁹ Resultado de sumar 26.82% de pacientes CYP2D6*1 con niveles entre 13-19ng/mL y 4.87% de pacientes CYP2D6*1 con niveles inferiores a 13ng/mL.

A este respecto, mencionar el trabajo de Saladores y col.⁽⁶⁵⁾ quienes observaron que la formación de endoxifeno con respecto al gen CYP2D6 no presenta diferencias entre mujeres pre y postmenopáusicas, aunque sugieren que la existencia de otros factores, a parte del gen CYP2D6, contribuyen en la biodisponibilidad del endoxifeno, haciendo que la variabilidad del mismo metabolito sea predecible en menor medida; así como, la respuesta al tratamiento en base a sólo el genotipado CYP2D6.

Los resultados obtenidos después de esta clasificación resultaron ser alentadores. Obtuvimos una conclusión positiva dentro de los objetivos marcados y se abrió una puerta a la Farmacogenética con implicaciones médico-legales en la medicina personalizada al requerir la emisión y deliberación de un informe farmacogenético.

Variantes genéticas CYP2D6 con baja actividad metabólica por el tamoxifeno, auguraban un menor éxito en la respuesta al tratamiento contra el cáncer de mama, pero como dato aislado en un informe farmacogenético tampoco era suficiente. Se requeriría medir la concentración en sangre de cada uno de los metabolitos durante el tratamiento con tamoxifeno; por lo menos su molécula madre para saber si la paciente cumple el tratamiento, y el endoxifeno como metabolito bioactivo final de la biotransformación. Ahora bien, el lector podría entender que con el análisis cuantitativo es suficiente para seguir a la paciente, sin embargo, no es así. El dato aislado de endoxifeno también está siendo debatido, prueba de ello es la variabilidad que pudiera tener por factores diferentes al CYP2D6. Recordemos que algunas de nuestras pacientes con gen nativo CYP2D6*1 tenían niveles bajos de endoxifeno y, de no haberse analizado el gen CYP2D6, el médico no podría deliberar sobre otras posibles causas que justificasen esa disminución como incumplimiento del tratamiento, deficiencia vitamina D, índice de masa corporal elevado, ingesta de medicamentos inhibidores de la enzima CYP2D6

o existencia de otra alteración genética. La complejidad metabólica del tamoxifeno obliga a una interpretación genética y metabólica.

En cuanto a los resultados obtenidos para el N-desmetil-tamoxifeno, destacar que no hemos observado diferencias intergrupos polimórficos CYP2D6 de baja actividad metabólica, y sobre la base de estos resultados, mencionar que en la comunidad científica se describe una fuerte asociación entre el cociente de las concentraciones de N-desmetil-tamoxifeno y endoxifeno con la supervivencia libre de recaídas (DFRS) ⁽⁶⁵⁾. El riesgo de recaída es mayor cuanto más se incrementaba este cociente a causa de una baja concentración de endoxifeno, corroborándose la relevancia clínica de la vía metabólica principal mediada por la enzima CYP2D6 para la respuesta al tamoxifeno.

Un cociente elevado por una baja concentración de endoxifeno no solo nos alertará de un mal pronóstico, sino también de lo que está pasando mayoritariamente en la vía metabólica principal. Recordemos que la vía principal metaboliza el tamoxifeno en un 90% mediante la enzima CYP3A4/5, dando lugar a la formación del metabolito primario N-desmetil-tamoxifeno con una velocidad máxima de 62 pmol/min/mg proteína, y que la transformación del N-desmetil-tamoxifeno en endoxifeno depende en un 100% de la enzima CYP2D6. Por tanto, sabiendo que la concentración de N-desmetil-tamoxifeno no presenta diferencias inter-grupos polimórficos, la consideración del cociente N-desmetil-tamoxifeno/Endoxifeno, en lugar del dato aislado de endoxifeno, nos aportará una mayor información de lo que está pasando en la ruta metabólica. Así, un genotipo nativo CYP2D6*1 con un valor bajo de endoxifeno y un valor bajo de N-desmetil-tamoxifeno nos indicará que pueden existir otros factores genéticos, ambientales, farmacológicos o de no seguimiento del tratamiento causantes de los niveles reducidos, excluyéndose el gen CYP2D6.

Las correlaciones investigadas a este nivel establecen dos cut-off o puntos de corte, de forma que si el cociente tiene un valor logarítmico mayor de 2,06 la paciente tiene mal pronóstico, y si el valor logarítmico está entre 1,49-2,06 tiene un pronóstico medio o moderado ⁽⁶⁵⁾. Pacientes con valores logarítmicos inferiores a 1,49 tienen mejores resultados. De nuevo, se plantea la discusión sobre cómo podrían afectar estos datos, los cuales resumimos en tabla siguiente, a la hora de interpretar nuestros análisis en un informe farmacogenético.

	Pronóstico Bueno	Pronóstico Moderado	Mal pronóstico
Ratio [N-D-TAM] / [Endoxifeno]	<31 $\text{Log}_{10} < 1,49$	31-115 $\text{Log}_{10} = 1,49-2,06$	>115 $\text{Log}_{10} > 2,06$

En el caso de la ratio calculada a partir del logaritmo de las concentraciones metabólicas obtenidas para N-desmetil-tamoxifeno y endoxifeno, en los 65 casos clínicos coincidentes genotípicamente con nuestra población de referencia, podemos constatar que todos los genotipos nativos CYP2D6*1 con metabolismo normal presentaron una ratio inferior a 1,49. Ello se correlaciona con las observaciones de Saladores y colaboradores ⁽⁶⁵⁾ e indica que tendrían un buen pronóstico; sin embargo, como hemos comentado anteriormente, algunas de estas pacientes CYP2D6*1 no alcanzaban un valor de endoxifeno óptimo, y con esta clasificación pasarían como válidas. Saladores y colaboradores ⁽⁶⁵⁾ observaron que pacientes, con un índice corporal mayor, presentaban niveles de N-desmetil-tamoxifeno más bajos, lo cual se explica por el tejido adiposo que actúa como compartimento en el que se acumulan los metabolitos lipofílicos derivados del tamoxifeno. Variaciones que pueden justificar una concentración circulante más baja del N-desmetil-tamoxifeno, y en consecuencia unas ratios más bajas, próximas a un buen pronóstico. Nuevamente nos encontramos ante la necesidad de una

interpretación genética y metabólica. La ratio por sí sola no predice un buen pronóstico.

Respecto al resto de polimorfismos de baja actividad metabólica, CYP2D6*3, *4, *5, *6, *9, *10 y *41, se constató un pronóstico moderado o malo en todos ellos. Mencionar que, en cinco pacientes, una de ellas con alelo *5, otra con alelo *41 y tres con alelos *4, presentaron un pronóstico bueno, aunque su cociente estaba muy próximo al punto de corte de pronóstico moderado. Variabilidad que Schroth y col.⁽⁶²⁾ señalan en diplotipos mezcla de alelos extensivos e intermedios. No obstante, también habría que valorar otros factores no genéticos. Por ello, se plantea este punto como discusión al entender que se requiere de su monitorización para que el clínico valore a la paciente en su consulta.

7.6 DISCUSIÓN SOBRE LA ESTRATEGIA PARA EL ESTUDIO DEL TAMOXIFENO

A efectos prácticos, para arrojar luz sobre las controversias mencionadas sobre la utilidad del gen CYP2D6 para la predicción de eficacia del tamoxifeno⁽⁷⁶⁾, y aún sabiendo que requiere de una mayor caracterización, se puede argumentar que el análisis genético de los polimorfismos CYP2D6 de baja actividad debe utilizarse en la práctica clínica por su valor predictivo, permitiendo orientar las decisiones iniciales de tratamiento, seleccionar las pacientes para un seguimiento en el tiempo y pautar las modificaciones o intervenciones en la dosis de tamoxifeno⁽²¹⁶⁾.

No debemos ignorar que las combinaciones alélicas de los polimórficos *3, *4, *5, *6, *9, *10 y *41 de baja actividad metabólica, según resultados obtenidos, presentaban un nivel de endoxifeno circulante significativamente inferior al encontrado en pacientes CYP2D6*1 metabólicamente normales, lo que respalda a priori la relevancia del genotipo CYP2D6 como predictor del metabolismo del tamoxifeno en mujeres pre y postmenopáusicas⁽⁷²⁻⁷⁵⁾.

Es importantísimo que la concentración de endoxifeno como metabolito de alta afinidad por los receptores estrogénicos, como dice en su trabajo Maximov y col.⁽⁶⁴⁾, pueda competir con las concentraciones de estrógenos equivalentes a las presentadas en las pacientes premenopáusicas y postmenopáusicas, para así bloquear la replicación de las células de cáncer de mama.

Iniciado el tratamiento con tamoxifeno, y suponiendo que la variable endoxifeno es pronóstico para la respuesta de un paciente al tratamiento, se deberá solicitar un estudio genotipo-fenotipo para una correcta clasificación metabólica de la paciente. La monitorización del N-desmetil-tamoxifeno y endoxifeno deberá realizarse por primera vez a los cuatro meses del inicio del tratamiento, una vez alcanzada la fase estacionaria de los metabolitos principales. Este estudio deberá solicitarse tanto para los genotipos homocigotos CYP2D6*1 como para otros genotipos de baja actividad metabólica, ya que predecirá en mayor o menor medida la variabilidad observada⁽⁶²⁾.

En función de los resultados obtenidos, el clínico decidirá si procede el seguimiento de su monitorización terapéutica y ajuste de dosis⁽²¹⁶⁾.

Así mismo, pacientes con niveles de endoxifeno excesivamente bajos, podría conculcar la toma de decisiones en virtud de criterios de predicción y, en consecuencia, ejercer una deliberación con la paciente para suspender el tratamiento o incorporar otros tratamientos alternativos como: aumento escalado de la dosis estándar de tamoxifeno^(66,67,68, 216); dosis estándar de tamoxifeno suplementada con endoxifeno⁽⁶⁹⁾; tratamiento con Z-endoxifeno clorhidrato⁽⁷⁰⁾; tratamiento con aromatasas combinado con una supresión ovárica en pacientes premenopáusicas⁽⁷¹⁾.

Por último, destacar la estrategia aportada para el estudio de los polimorfismos CYP2D6 en pacientes con cáncer de mama hormonodependientes en tratamiento con tamoxifeno. La falta de pautas o normativas para detectar los fenotipos metabólicos anómalos del gen CYP2D6, nos sugiere considerar la propuesta de un algoritmo o, al menos, una estrategia farmacogenética esquematizada que se expone en el anexo X^{hhh}.

^{hhh} Este algoritmo se sugiere en base a las siguientes consideraciones:

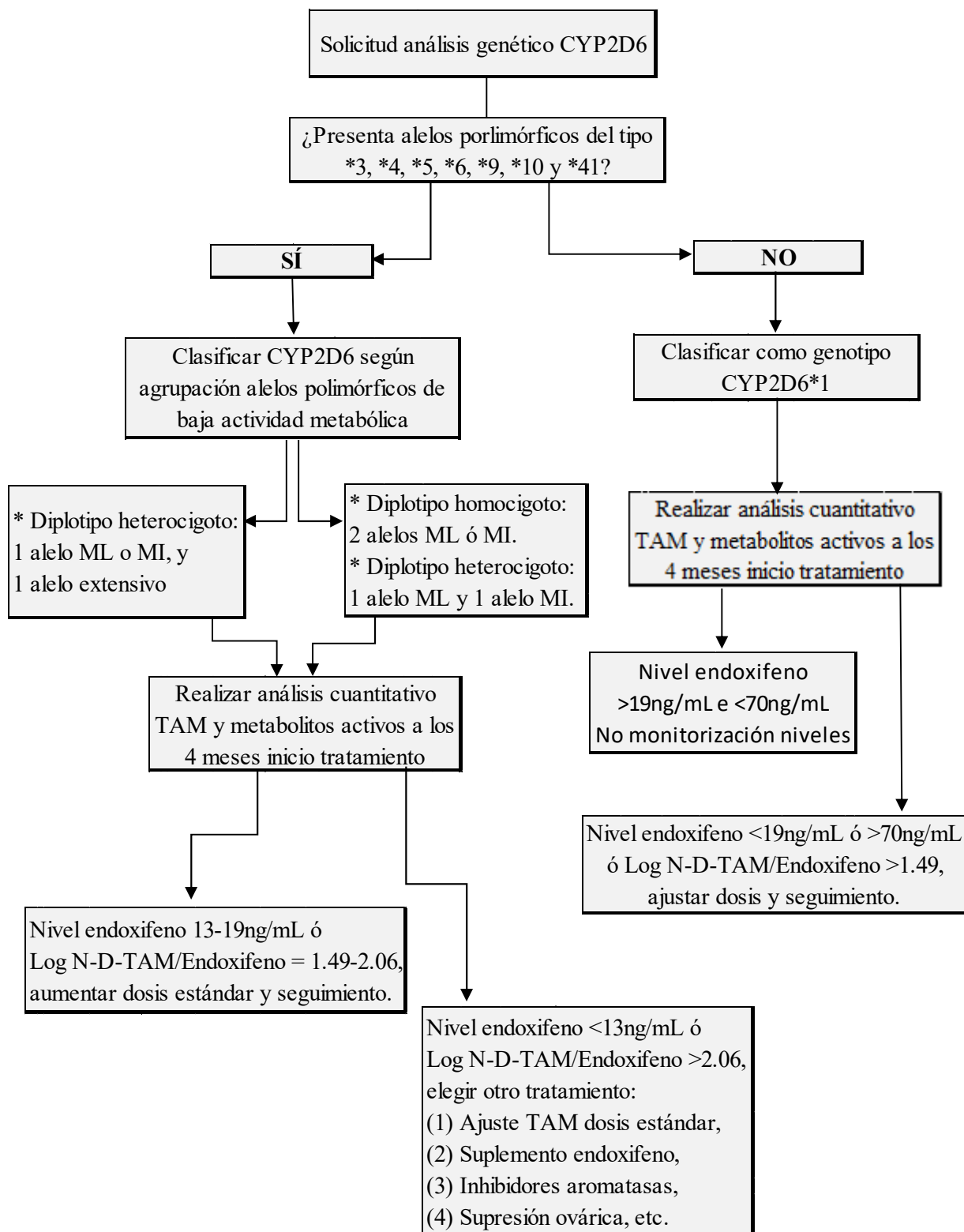
(1) El genotipado del CYP2D6 se debería realizar para orientar las decisiones iniciales del tratamiento. Su valor predictivo permite seleccionar pacientes para su seguimiento en el tiempo y pautar las modificaciones en la dosis de tamoxifeno. En base a la ausencia o presencia de alelos polimórficos de baja actividad metabólica, su agrupación alélica y niveles de endoxifeno circulante, se realizará una discriminación terapéutica.

(2) Se identifica como genotipo CYP2D6*1, todo aquel que no presente un alelo *3, *4, *5, *6, *9, *10 ó *41. Ello requiere estandarizar la relación genotipo-fenotipo. La existencia de alelos ultrarrápidos dará lugar a concentraciones elevadas de endoxifeno o, por el contrario, la posibilidad de clasificar en este grupo a un polimorfismo de baja actividad metabólica con frecuencia alélica muy baja, no considerado en la PCR ARMS multiplex, podría dar lugar a concentraciones muy bajas de endoxifeno. Así mismo, factores medioambientales como falta de vitamina D, medicamentos inhibidores de la enzima CYP2D6 u otros genes polimórficos, diferentes al CYP2D6, implicados en la metabolización del tamoxifeno, podrían dar lugar a niveles bajos de endoxifeno. Fluctuaciones en los niveles plasmáticos de los precursores 4-OH-TAM y N-D-TAM pueden ser debidas a las variantes polimórficas de los genes CYP2C9 y CYP3A5 mayoritariamente, no estudiadas en esta tesis y que podrían justificar la variabilidad del endoxifeno ⁽⁶²⁾.

Hacer especial mención de los medicamentos prescritos durante el tratamiento. Un ejemplo es el uso extendido de los inhibidores de la recaptación de serotonina selectiva (IRSS) ⁽¹⁰¹⁾ como la paroxetina, para tratar la depresión o para aliviar los sofocos inducidos por el tamoxifeno en pacientes con cáncer de mama, a fin de mejorar su calidad de vida durante el tratamiento a largo plazo. Los IRSS inhiben la enzima CYP2D6 ⁽¹⁰²⁾, por lo que es imposible no imaginar una interacción medicamentosa por la que los IRSS bloquearán la activación metabólica del tamoxifeno. Hasta un 45% de las mujeres en tratamiento con tamoxifeno sufren sofocos clasificados como graves ⁽⁸⁵⁾, lo que hace intuir que también aquellas pacientes que tuviesen una enzima del gen CYP2D6 funcionalmente normal, podrían no tener el mismo éxito terapéutico si se les prescribiese IRSS. De hecho, Stearns y col. ⁽¹⁰¹⁾ demostraron que la paroxetina, uno de los IRSS más potente, reducía en un 64% los niveles de endoxifeno durante la terapia adyuvante con tamoxifeno en mujeres con la enzima normal del gen CYP2D6*1. Ello significa que el 58,9% de la población de referencia pueden tener un mal resultado si les prescriben IRSS; así como cualquier otro medicamento inhibidor de la enzima CYP2D6.

(3) Se argumenta una monitorización a los 4 meses después del inicio del tratamiento, porque es cuando los metabolitos primarios alcanzan su fase estacionaria.

ANEXO X. ESTRATEGIA PARA UN ESTUDIO SOBRE TAMOXIFENO



7.7 DISCUSIÓN SOBRE LOS CRITERIOS ASISTENCIALES. INFORME FARMACOGENÉTICO

Una limitación del estudio con pacientes diagnosticadas de cáncer de mama receptores estrogénicos positivos es su tamaño muestral; aunque, en lo que respecta al estudio de la población de referencia en la Comunidad Autónoma de Madrid, es uno de los mayores análisis realizados en España, así como en otros países europeos (ver anexo IX). Es verdad que se necesitan más casos clínicos para evaluar el gen CYP2D6 y su clínica con suficiente poder estadístico, pudiéndose cuestionar que este algoritmo farmacogenético puede dar lugar a un sesgo.

A este respecto, decir que la inclusión de un gran número de pacientes con cáncer de mama no es posible en un plazo de tiempo razonable para una tesis doctoral, y ello nos aboga a entender que son datos preliminares. No obstante, dado que son lo suficientemente ilustrativos y coincidentes con la literatura científica consultada, nos permite sugerir que un criterio de inclusión estricto del paciente, un estudio genético, un análisis metabólico del tamoxifeno y un tiempo de seguimiento, son esenciales para la interpretación de los resultados relacionados con el gen CYP2D6.

Así pues, aunque en un futuro se requiera la confirmación de estudios más completos, una prueba de genotipado que discrimina a las pacientes en base a si presentan uno o dos alelos polimórficos de baja actividad, revela la posibilidad de predecir si los pacientes tendrán concentraciones beneficiosas de endoxifeno. Esta interpretación simplificada de la prueba podrá ayudar a los médicos a ratificar sus decisiones iniciales de tratamiento, es decir, prescribir dosis estándar versus ajuste de dosis de tamoxifeno, o elegir otro tratamiento como un inhibidor de la aromatasa junto con una supresión ovárica en el caso de pacientes premenopáusicas.

En su conjunto, podemos decir que nuestros datos, aunque son exploratorios y esperan la confirmación de estudios más completos, respaldan la idea de que los

niveles del endoxifeno están influenciados por la combinación de alelos polimórficos del gen CYP2D6 con baja actividad metabólica, y que, en base a los criterios asistenciales, se requiere una consideración médico legal y deontológica.

Recordar de nuevo que la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) facilitó en 2016, en base al estudio GLOBOCAN 2012, una visión descriptiva de lo que representa esta enfermedad en Españaⁱⁱⁱ. El cáncer de mama tuvo la mayor incidencia de entre todos los cánceres en mujeres, con un total de 26.370 casos ⁱⁱⁱ nuevos, una prevalencia ^{kkk} a cinco años de 104.405 casos y una mortalidad de 6477 mujeres. Ello significa que, aún teniendo una prevalencia muy alta, el número de mujeres fallecidas anualmente es significativo y equivalente al 24% de las mujeres diagnosticadas de cáncer de mama cada año, constatándose que en España es el cáncer más frecuente en mujeres y, en el mundo, la primera causa de muerte por cáncer en regiones desarrolladas (15,4% del total)ⁱⁱⁱ.

Aproximadamente, el 76% de los carcinomas primarios de mama son RE+ ⁽⁵⁸⁾, y de éstos, sólo responden a la terapia hormonal entre el 55-60%. Las pacientes que no responden al tamoxifeno se atribuye entre otros factores a la genética ⁽⁵⁷⁾.

ⁱⁱⁱ Sociedad Española de Oncología Médica. Las Cifras del Cáncer en España 2017. www.seom.org

ⁱⁱⁱ Resultado obtenido de la suma de casos por grupos de edad estimados en España por IARC en noviembre 2015: 2470 casos entre 15-39 años; 2140 entre 40-44; 2743 entre 45-49; 3013 entre 50-54; 2719 entre 55-59; 2540 entre 60-64; 2296 entre 65-69; 1989 entre 70-74 y 5305 casos para >75 años.

^{kkk} La prevalencia es la proporción de pacientes diagnosticados con cáncer de mama que continúan vivos a los 5 años de diagnóstico. Incluye por tanto los pacientes con diagnóstico reciente y diagnosticados en el pasado. Está directamente relacionada con la supervivencia; es decir, la prevalencia es más elevada en los tumores con mayor supervivencia. Esta alta prevalencia, según los datos del Instituto Nacional de Estadística (INE), constituye una de las principales causas de ingreso hospitalario, siendo la quinta causa en mujeres 912 ingresos/100.000 habitantes.

ⁱⁱⁱ International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. <http://globocan.iarc.fr>

Es evidente que, en este contexto, en el que además conocemos que un 22,35% de mujeres de nuestra población de referencia puede presentar al menos uno de los alelos CYP2D6*3, *4, *5, *6, *9, *10 y *41, de menor actividad metabólica y mayor frecuencia, y que una de cada ocho mujeres puede tener un cáncer de mama en algún momento de su vida ⁿⁿ, nos lleva a considerar como punto de discusión si se podrían plantear cambios en un futuro a fin de consolidar el informe farmacogenético en el estudio del CYP2D6 y mejorar el pronóstico, especialmente en pacientes premenopáusicas.

No olvidemos que, en noviembre de 2015, la IARC (International Agency for Research on Cancer) estimó 2.479 nuevos casos diagnosticados por año, entre los 15 y 39 años, grupo de edad en el que existe actividad ovárica y se recomienda utilizar el tamoxifeno como hormonoterapia. Los inhibidores de la aromatasa no son una alternativa, a priori, para este grupo de edad, y el hecho de que el 22.35% pueda tener al menos un alelo con baja actividad metabólica para el tamoxifeno, nos vuelve a posicionar en la hipótesis de si un informe farmacogenético podría mejorar el tratamiento y evitar una pérdida de oportunidad terapéutica.

Además, se alerta en la propia ficha técnica presentada por los laboratorios farmacéuticos en la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS), sobre advertencias y precauciones especiales de empleo: *"Pacientes metabolizadores lentos del CYP2D6 producen niveles plasmáticos bajos de endoxifeno, uno de los metabolitos activos más importantes de tamoxifeno"*. Polimorfismos que han sido asociados a la variabilidad en la respuesta clínica: *"Los datos clínicos disponibles sugieren que los pacientes que son homocigotos para los alelos no funcionales del CYP2D6, pueden experimentar una disminución del efecto del tamoxifeno en el tratamiento del cáncer de mama"*. Ello significa que existe una vinculación clínica y que muchas pacientes se verán privadas de un mejor

beneficio terapéutico si no se realiza un estudio de los polimorfismos genéticos. Pruebas que nosotros mismos hemos podido poner a punto en el laboratorio y que pueden realizarse en la rutina clínica gracias a las últimas innovaciones tecnológicas.

Por lo tanto, se evidencian criterios asistenciales muy importantes como son el elevado número de casos de cáncer de mama y su cronicidad durante años en tratamiento con tamoxifeno para reducir el riesgo de recidiva, sin olvidarnos de los efectos adversos vinculados a fármacos inhibidores de la enzima CYP2D6 y polimorfismos anómalos, y el control y seguimiento del cumplimiento terapéutico mediante la monitorización del tamoxifeno. Criterios asistenciales suficientes que justifican, desde un punto de vista médico ético legal y deontológico, la incorporación del informe farmacogenético en el marco de la medicina personalizada y en la historia clínica del paciente.

Razones clínicas que, en nuestro estudio con pacientes enfermas, hemos asociado con el cumplimiento del tratamiento y su respuesta metabólica.

Así, el ejercicio de la medicina personalizada nos lleva a establecer la necesidad de un informe farmacogenético como modelo innovador de la asistencia sanitaria en pacientes crónicos y polimedicados, especialmente cuando existen razones clínicas, metabólicas, biotécnicas y asistenciales como las expuestas hasta el momento en el modelo de cáncer de mama con tamoxifeno; sin embargo, ello requiere además de la existencia de aspectos médico-legales que lo justifiquen y de normas legales que tengan latente la medicina personalizada (figura 18).

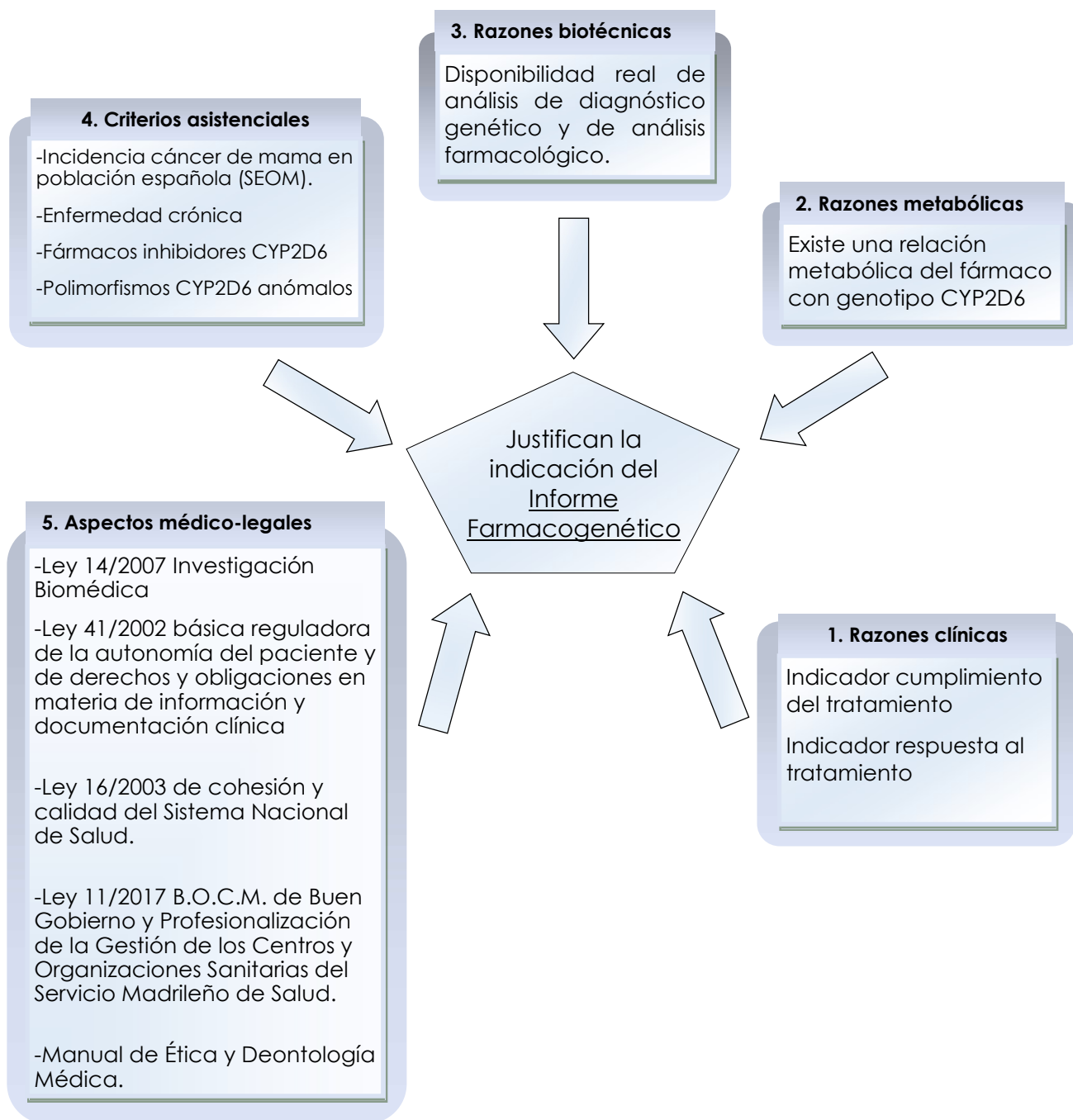


Figura 21. Se enumeran cinco motivos que justifican, desde un punto de vista médico ético legal y deontológico, la incorporación del informe farmacogenético en la historia clínica del paciente, que son: razones clínicas, metabólicas y biotécnicas, criterios asistenciales y aspectos médico-legales.

7.8 DISCUSIÓN MÉDICO-LEGAL

La realización de un informe farmacogenético exige en primer lugar un criterio de indicación desde un punto de vista médico legal y deontológico. En este sentido, nosotros entendemos que el oncólogo clínico debe considerar tres posibles criterios de indicación:

1º Existencia de pacientes crónicos con cáncer de mama en tratamiento con tamoxifeno con un riesgo genético. Recordemos que, a raíz de nuestro trabajo experimental, se desprende la necesidad de realizarse un diagnóstico genético del polimorfismo CYP2D6, al mismo tiempo que la cuantificación analítica del endoxifeno. Dichos resultados indicarán la existencia o no de factores que justifiquen niveles bajos de endoxifeno, lo que según "lex artis ad hoc" del médico ^{mmm}, podría corregir bien escalando ⁽²¹⁶⁾ la dosis estándar terapéutica hasta alcanzar los niveles de referencia para endoxifeno, bien cambiando el tratamiento.

2º Existencia de fármacos inhibidores de la enzima CYP2D6. La paroxetina es un ejemplo claro, ya que su uso para tratar la depresión o para aliviar los sofocos inducidos por el tamoxifeno, está extendido en las pacientes con cáncer de mama.

3º Existencia de pacientes con riesgo de incumplimiento terapéutico. Recordemos aquel caso clínico con un genotipo CYP2D6*4/*41, el cual no sólo tenía dos alelos polimórficos de baja actividad metabólica, además no cumplía el tratamiento y, en consecuencia, su nivel de tamoxifeno estaba por debajo del rango de normalidad calculado para la población metabólicamente normal CYP2D6*1.

^{mmm} La pregunta que nos formulamos es qué se entiende por "lex artis ad hoc". Consultando la jurisprudencia de la Sentencia Sala 1ª de lo civil del Tribunal Superior de Justicia de Palma de Mallorca, de 11 de marzo de 1991, dice que "lex artis ad hoc" es <<aquel criterio valorativo de la corrección del concreto acto médico ejecutado por el profesional de la medicina que tiene en cuenta las especialidades características de su autor, de la profesión, de la complejidad y trascendencia vital del paciente y, en su caso, de la influencia de otros factores endógenos para calificar dicho acto de conforme o no con la técnica normal requerida...>>.

En segundo lugar, otro aspecto médico legal resultante de la solicitud de informes farmacogenéticos exige la elaboración específica de un consentimiento informado, a fin de que la paciente y familia comprenda la finalidad y riesgos de su no realización.

Los resultados obtenidos y la discusión desarrollada sugieren que la no solicitud de este estudio farmacogenético omite pruebas de laboratorio que retrasan la obtención de un diagnóstico certero y que, de haberse pedido, hubiera podido evitar o minimizar un efecto adverso no deseable alargando la supervivencia libre de recaídas. Se plantea, en definitiva, un presunto diagnóstico tardío que en un futuro debería enmarcarse bajo la doctrina de la pérdida de oportunidad del paciente. Situación esta última que sólo acontecería si el informe farmacogenético fuese obligado en la praxis médica y se hubiera recabado el consentimiento informado farmacogenético de forma incompleta. Imaginemos a nuestra supuesta paciente a la que no se le informa de la existencia de pruebas farmacogenéticas que aseguran un tratamiento más eficiente. Ésta debería ser indemnizada por entenderse que la actuación antijurídica de la Administración Pública Sanitaria priva a la paciente de la posibilidad de evitar un daño que finalmente se produjo ⁿⁿⁿ.

Así mismo, en lo que refiere a nuestra supuesta paciente no bien informada ^{ooo}, es posible que la Administración Pública Sanitaria no disponga de los medios

ⁿⁿⁿ La sentencia ROJ:STS 3463/2010 de 25 de junio de 2010 de la sección sexta de la Sala Tercera del Tribunal Supremo señala que <<la pérdida de oportunidad se define como la privación de expectativas,... y constituye, un daño antijurídico, puesto que, aunque la incertidumbre en los resultados es consustancial a la práctica de la medicina (circunstancia que explica la inexistencia de un derecho a la curación), los ciudadanos deben contar, frente a los servicios públicos de la salud, con la garantía de que, al menos, van a ser tratados con diligencia aplicando los medios y los instrumentos que la ciencia médica pone a disposición de las administraciones sanitarias; tienen derecho a que, como dice la doctrina francesa, no se produzca una falta de servicio.

^{ooo} Al derecho a la información del paciente y al "consentimiento informado" se refiere la Ley 41/2002. La Sección Cuarta de la Sala Tercera del Tribunal Supremo, en Sentencia ROJ: STS 55/2012 refiere la falta o insuficiencia de la información debida al paciente como <<una infracción de la "lex artis ad hoc", que lesiona su derecho de autodeterminación al

instrumentales y humanos para desarrollar este diagnóstico farmacogenético, pero en tal caso no excusa al médico a que se informe a la paciente de la existencia y ventajas de hacerse estos biomarcadores ^{PPP}.

A su tenor, la elaboración específica de un consentimiento informado supone la conformidad libre, voluntaria y consciente de la paciente, manifestada en el pleno uso de sus facultades después de recibir la información adecuada sobre la finalidad y riesgo de la no realización del informe farmacogenético, para que tenga lugar una actuación que afecta a la salud, según establece el artículo 3 de la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica. Así como, en el artículo 4 de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica. Se trata de que, una vez recibida la información, la paciente valore las opciones propias del caso. Según jurisprudencia, pesará sobre la Administración Pública Sanitaria la carga de probar que cumplió con la obligación de recabar el necesario consentimiento informado. Las implicaciones ético-jurídicas de este tipo de pruebas exigen contar con el consentimiento expreso y escrito de todas las partes implicadas. Conviene ser muy cuidadoso en el uso de estas técnicas sin contar con la autorización de la afectada o de quien ejerza la tutela. Por lo tanto, entendemos que la variabilidad entre pacientes en la respuesta al tamoxifeno debe ser estudiada farmacogenéticamente e informada a la paciente por las implicaciones éticas, sociales, legales y, en especial, por los riesgos que supone su no realización.

impedirle elegir con conocimiento y de acuerdo con sus propios intereses y preferencias entre las diversas opciones vitales que se le presentan. Causa pues un daño moral>>. El incumplimiento de este deber de información sólo deviene irrelevante y no da por tanto derecho a indemnización cuando ese resultado dañoso o perjudicial no tiene su causa en el acto médico o asistencia sanitaria.

^{PPP} Biomarcador: se define como aquellas moléculas susceptibles de ser identificadas y/o cuantificadas en el laboratorio, cuya medida aporta información relevante para la gestión clínica del paciente.

En tercer lugar, dentro de los aspectos médico-legales que estamos exponiendo, decir que la realización de informes farmacogenéticos está indirectamente contemplada en la Ley de Investigación biomédica. En su artículo 9 marca los límites de los análisis genéticos, pudiéndose realizar pruebas predictivas en virtud de la finalidad del estudio de las diferencias inter-individuales en la respuesta a los fármacos y las interacciones genético-ambientales. Por lo tanto, puede ser a nuestro juicio una exigencia en el marco de las prestaciones sanitarias, más cuando las propias fichas técnicas presentadas por la industria farmacéutica en la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios advierten y refieren a precauciones especiales en pacientes con alelos no funcionales del gen CYP2D6 por experimentar una disminución del efecto del tamoxifeno. Vinculación clínica publicada en la ficha técnica del medicamento ⁹⁹⁹, aunque no en el folleto interno, informándose al médico del riesgo que ello supone, por lo que no se puede atribuir desconocimiento y ahonda en la exigencia de las prestaciones sanitarias. No obstante, es verdad que, en ninguno de los casos, ni en la ficha técnica ni en el folleto interno, se sugiere realizar análisis farmacogenéticos.

En cuarto lugar, no menos considerar, dentro de los aspectos médico-legales, que el informe farmacogenético con la adecuada interpretación facultativa debería incorporarse a la historia clínica acorde con las consideraciones de la Ley 41/2002. En su artículo 15, sobre contenido de la historia clínica de cada paciente, deja una puerta abierta a los informes de exploraciones complementarias, como son los informes farmacogenéticos, que son trascendentales para el conocimiento del estado de la paciente con cáncer de mama.

⁹⁹⁹ Bot PLUS: Base de datos del Conocimiento Sanitario materializada por el Consejo General de Colegios Oficiales Farmacéuticos mediante la web www.portalfarma.com

En quinto lugar, entendemos que el informe farmacogenético parte de una medicina personalizada y de precisión, por lo que podría conculcar la posterior toma de decisiones de la paciente, como suspender el tratamiento o incorporar tratamientos alternativos. Todo ello en virtud de criterios de predicción que pueden afectar la toma de decisiones, aspecto médico legal importantísimo ya que nos dirige al ejercicio de la deliberación. El Manual de Ética y Deontología Médica ^{III}, trata de las pruebas genéticas en el capítulo XIII, y con buen criterio indica que no puede parcelarse en su interpretación y aplicación, requiere de una integración de su contenido para resolver dudas no sólo en los entornos donde la certeza es posible, sino en las decisiones que se deben tomar en situaciones de incertidumbre, donde se requiere una madurez científica y personal, para que la aplicación del *lex artis ad hoc* del médico se ajuste a las normas de Deontología.

Como hemos visto anteriormente, algunos de los problemas éticos de las pruebas genéticas son el consentimiento específico del paciente para realizar un estudio farmacogenético, pero ello requiere de una capacidad de decisión que sólo será posible con un correcto informe farmacogenético y consejo genético del médico previa deliberación con otros profesionales de la salud. El colectivo médico será tanto más creíble, cuanto mejor y con más transparencia cumpla esta tarea. Es muy importante que el médico actúe de forma correcta técnica y éticamente. Por ello, y dado que existen cambios tecnológicos y organizativos ajenos al médico, exige una relación del paciente con equipos multidisciplinarios, creándose nuevas realidades.

Así, entendemos que el informe farmacogenético constituye, además, una forma de interconsulta con otros facultativos clínicos, en nuestro caso preferentemente

^{III} Consejo General de Colegios Oficiales de Médicos. Organización Médica Colegial (OMC). www.cgcom.es

oncólogos, y por lo tanto afectaría al ejercicio de la actividad asistencial sanitaria en el contexto de la coordinación de equipos de trabajo como se recoge en su capítulo VIII del Manual de Ética y Deontología Médica.

Por otro lado, el informe farmacogenético incorporado a la historia clínica puede ser objeto de análisis pericial en los casos que se puede ver afectada la responsabilidad profesional sanitaria.

El médico, en virtud del consentimiento expreso de la paciente, accede a una información requerida para diagnosticar si existe una causa genética que justifique una variabilidad en la respuesta al fármaco, y autoriza el uso de la información genética en este fin, cualquier otro uso distinto al autorizado supondrá la conculcación de los derechos de la paciente.

No sólo se exige un riguroso respeto de los derechos de la paciente, sino de la aplicación de la metodología más eficaz y rigurosa desde una perspectiva científica. No se pueden ni deben utilizar técnicas que no estén lo suficientemente contrastadas más aún cuando en función de los resultados emitidos en el informe farmacogenético puede conculcar la posterior toma de decisiones del paciente en virtud de criterios de predicción y el ejercicio de la deliberación.

La importancia jurídica de un estudio farmacogenético mal realizado trasciende a las personas afectadas y un error puede cuestionar la profesionalidad sanitaria. Por lo tanto, el informe farmacogenético vuelve a ser importante, especialmente en las circunstancias en las que se haya podido solicitar una segunda opinión relacionada con un posible diagnóstico farmacogenético anómalo. Sería el caso de responsabilidad vinculada a efectos adversos por medicamentos. Todo paciente tiene derecho a solicitar una segunda opinión, y el médico que ha intervenido en su atención en primer lugar debe facilitar todos los datos que se disponga, entre ellos el posible informe farmacogenético. La relación entre colegas cuando hay una

segunda opinión queda de forma clarificadora en el artículo 39.2 del Manual de Ética y Deontología Médica.

Por esto mismo, se considera fundamental que las muestras biológicas para análisis de ADN se obtengan de las regiones genómicas que más fiabilidad demuestren y guardando siempre una correcta cadena de custodia.

La facilidad que ofrecen algunos laboratorios para pruebas genéticas a partir de matrices biológicas que se envían por correo, pueden generar conflictos ético-legales sobre el procedimiento de obtención de la muestra cuando no se cuenta con la autorización previa. A este respecto, decir que la Ley 14/2007 de Investigación biomédica, en su artículo 1.2 regula la realización de los análisis genéticos y el tratamiento de sus datos dentro del ámbito sanitario.

Es obvio que un campo de aplicación creciente es la Farmacogenética, especialmente en estudios relacionados con el metabolismo del fármaco como acontece con el tamoxifeno. El papel del gen CYP2D6 que codifica la enzima con el mismo nombre, responsable principal de la formación del metabolito bioactivo endoxifeno, puede presentar variaciones genéticas en la secuencia de ADN, dando lugar a variantes enzimáticas menos activas como CYP2D6*3, *4, *5, *6, *9, *10 y *41 en relación con la variante más activa CYP2D6*1. Numerosos estudios demuestran la asociación molecular entre estos genotipos, niveles de endoxifeno y supervivencia libre de recaídas en pacientes con cáncer de mama. Factores que pueden explicar, en parte, porqué un 40% de las pacientes ⁽⁴⁾ en tratamiento con tamoxifeno no responde igual para una dosis estándar de tamoxifeno.

El futuro inmediato de la Farmacogenética abre un amplio horizonte de posibilidades que están acompañadas de una serie de implicaciones médico-legales éticas y deontológicas, entre las que se incluye las limitaciones al acceso a estas pruebas por factores socioeconómicos, entre otras. Por ello, entendiendo que,

en base a los resultados obtenidos, es necesaria su integración en el marco de las prestaciones sanitarias y del buen funcionamiento de los servicios de salud, el informe farmacogenético estaría amparado por la Ley 16/2003 de cohesión y calidad del Sistema Nacional de Salud, así como por la Ley 11/2017 de 22 de diciembre, de Buen Gobierno y Profesionalización de la Gestión de los Centros y Organizaciones Sanitarias del Servicio Madrileño de Salud, publicada en el Boletín Oficial de la Comunidad de Madrid (BOCM) del 3 de enero de 2018, y que prioriza la calidad y humanización de la asistencia sanitaria.

La Asamblea de Madrid aprobó la Resolución 24/2015, la cual contenía como uno de los puntos que constituyen el denominador común del buen gobierno y buena gestión pública para los centros sanitarios, el establecimiento de instrumentos de autonomía de gestión y capacidad de innovación. La Ley 11/2017 del BOCM, concreta dichos instrumentos del buen gobierno y refuerza los órganos de asesoramiento y participación profesional, con el fin de una mayor garantía de rigor científico-profesional en la toma de decisiones y mejorar la calidad asistencial. En su artículo 14, establece que unas de las funciones de la Junta Técnica Asistencial, serán elaborar informes, dictámenes y recomendaciones sobre materias que afecten a las actividades asistenciales, así como proponer medidas tendentes a la actualización de los conocimientos, potenciar la investigación y mejorar la atención asistencial.

Sin duda alguna, el informe farmacogenético es ya una realidad que debería incorporarse en la atención sanitaria, más cuando la Sociedad Española de Farmacogenética y Farmacogenómica (SEEF) afirma que un 34% de los medicamentos tiene ficha técnica con biomarcadores genéticos, identificados en mayor medida, con los polimorfismos citocromo P450.

La respuesta heterogénea al tamoxifeno en función de la combinación de alelos polimórficos, hace que el informe farmacogenético sea obligado. Éste constituye uno de los pilares de la denominada medicina personalizada y de precisión, dado que aporta una información genética muy concreta relacionada con la eficacia del medicamento, a fin de ayudar en los problemas médicos actuales cuando el fármaco puede no alcanzar el objetivo terapéutico deseado. Por todo ello, respondemos a nuestra hipótesis planteada con la afirmación positiva de que se debería pedir el informe farmacogenético y se propone un modelo de informe farmacogenético innovador en el anexo X, con la esperanza de que la Ley 11/2017 del BOCM sea un buen motor regulador para que se incorpore de rutina en la asistencia sanitaria.

ANEXO X. MODELO INFORME FARMACOGENÉTICO

Nº Historia Clínica:

Nombre paciente:

Edad paciente:

Grupo poblacional:

Servicio solicitante:

Médico solicitante:

Teléfono contacto:

Fecha obtención muestra:

Diagnóstico clínico:

Fase climaterio o menopausia:

Identificación muestras recibidas:

Criterio de indicación:

Análisis solicitado:

Identificación muestras analizadas:

TRATAMIENTO CON TAMOXIFENO

NOMBRE COMERCIAL MEDICAMENTO	DOSIS	POSOLOGÍA	INICIO

OTROS MEDICAMENTOS

NOMBRE COMERCIAL	DOSIS	POSOLOGÍA	INICIO

Niveles Vitamina D:

Análisis realizado:

1. Extracción de material genético a partir de la muestra de sangre nº ID mediante lisis con proteinasa K y purificación en columnas con membrana de sílica.
2. Cuantificación de ADN mediante
3. Eliminación pseudogenes CYP2D7 y CYP2D8 no funcionales y con estructura similar al gen CYP2D6, y amplificación del gen CYP2D6 mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa larga (PCR larga). El diseño de los cebadores fue realizado en base a la secuencia nucleotídica de Kimura ⁽³⁷⁾.

4. Estudio polimorfismos metabolizadores pobres *3, *4, *5 y *6, así como metabolizadores intermedios *9, *10 y *41 del gen CYP2D6 (OMIM 124030), mediante amplificación, detección y edición de las regiones polimórficas rs1065852, rs5030655, rs3892097, rs35742686, rs5030656 y rs28371725, a través de las técnicas de PCR Amplification Refractory Mutation System (PCR ARMS) y electroforesis en condiciones desnaturalizantes con marcaje fluorescente. El diseño de los cebadores fue realizado en base a la secuencia nucleotídica actualizada AY545216.1.
5. Cuantificación niveles de tamoxifeno y metabolitos (N-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno y endoxifeno) a partir de la muestra de suero n° ID mediante técnicas de cromatografía de alta resolución (HPLC/MS-MS).

Todo el proceso analítico se realizó siguiendo recomendaciones nacionales e internacionales, así como los criterios de calidad y seguridad que garanticen la fiabilidad y precisión de los resultados obtenidos.

Fecha realización de los ensayos:

Inicio:

Finalización:

Resultados:

1. El polimorfismo genético CYP2D6 obtenido a partir de la muestra de sangre N° ID refiere a los alelos *4 y *41 en heterocigosis (CYP2D6*4/*41). Genotipo que predice ser un metabolizador lento.
2. El estudio metabólico del tamoxifeno y sus metabolitos bioactivos refiere las siguientes concentraciones en unidades logarítmicas:
 - a. Tamoxifeno: 1,90 (Valor medio Log₁₀ de CYP2D6*1 = 2,26)
 - b. N-desmetil-tamoxifeno: 2,42 (Valor medio Log₁₀ de CYP2D6*1 = 2,56)
 - c. 4-hidroxi-tamoxifeno: 0,02 (Valor medio Log₁₀ de CYP2D6*1 = 0,84)
 - d. Endoxifeno: 1,03 (Valor medio Log₁₀ de CYP2D6*1 = 1,35)

Consideraciones Científico-Legales:

Los alelos *3, *4, *5 y *6 representan el 98% de los alelos identificados en la población caucásica como metabolizadores pobres.

Los alelos *9, *10 y *41 representan entre el 70-80% de los metabolizadores intermedios.

El número y combinación de alelos polimórficos influye significativamente en los niveles de endoxifeno. Así, los genotipos en heterocigosis con una copia de alelo funcional u homocigosis con dos alelos polimórficos de baja actividad presentarán niveles de endoxifeno inferiores a la población enferma homocigótica CYP2D6*1.

La utilización de los fármacos referidos en la relación siguiente, están contraindicados en el tratamiento con tamoxifeno por inhibir la enzima CYP2D6 y disminuir los niveles de endoxifeno circulante en la paciente:

Bupropion	Fluoxetine	Paroxetine	Quinidine	Duloxetine	Terbinafine
Amiodarone	Cimetidine	Sertraline	Celecoxib	Chlorpheniramine	Chlorpromazine
Citalopram	Clemastine	Clomipramine	Cocaine	Diphenhydramine	Doxepin
Dexorubicin	Escitalopram	Halofrandrine	Histamine H1	Receptor antagonists	Hydroxyzine
Levomepromazine	Methadone	Metoclopramide	Mibefradil	Midodrine	Moclobemide
Perphenazine	Ranitidine	Red-haloperidol	Ritonavir	Ticlopidine	Tripelennamine

CONCLUSIONES:

El genotipo CYP2D6*4/*41 obtenido a partir de la muestra de sangre N° ID se identifica como un metabolizador pobre y predice una mala respuesta al tratamiento con tamoxifeno a dosis estándar.

Los niveles de tamoxifeno y 4-hidroxi-tamoxifeno sugieren un incumplimiento del tratamiento, y la concentración de endoxifeno confirma que es un metabolizador lento al presentar niveles muy por debajo del valor medio logarítmico calculado en una población enferma con genotipo homocigótico CYP2D6*1.

Así pues, estos resultados predicen una mala respuesta al tratamiento en condiciones de dosis estándar.

NOTAS ACLARATORIAS:

1. Las muestras referenciadas fueron enviadas mediante mensajería urgente sin refrigeración.

8. CONCLUSIONES

A. En relación con el Objetivo 1:

Conclusión primera

El estudio de los polimorfismos genéticos del citocromo CYP2D6 en mujeres sanas, así como en pacientes con cáncer de mama, permite identificar a la población mediante estos biomarcadores. Así mismo, hemos detectado polimorfismos compatibles con metabolización anómala del tamoxifeno en el rango de frecuencias poblacionales aceptadas por el Consorcio Europeo del citocromo P450.

Conclusión segunda.

El estudio de los polimorfismos CYP2D6 mediante la técnica PCR ARMS multiplex, modificada por nosotros, permite su uso habitual en medicina clínica, siendo de utilidad diagnóstica.

Los estudios de polimorfismos CYP2D6 con técnicas automatizadas pueden ser más eficaces, pero precisan realizar estudios de coste efectividad y seleccionar un perfil de polimorfismos, antes de que se puedan aplicar en el diagnóstico clínico.

B. En relación con el Objetivo 2:

Conclusión tercera

El estudio de niveles de tamoxifeno y metabolitos (N-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno y endoxifeno) cuantificados mediante técnicas de cromatografía líquida de alta resolución, modificada por nosotros, permite elaborar un informe analítico clínico que permite mejorar el control y seguimiento de las pacientes.

Conclusión cuarta

La asociación entre los resultados de polimorfismos CYP2D6 y la monitorización de los niveles de tamoxifeno y sus metabolitos permite elaborar un informe farmacogenético que posibilitaría detectar precozmente tratamientos sub-óptimos, evitar efectos adversos y detectar alteraciones en el seguimiento terapéutico.

C.En relación con el Objetivo 3:

Conclusión quinta

Con un criterio médico legal, el informe fármacogenético que proponemos está avalado en el artículo 9 de la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica, y puede ser considerado como un informe complementario a la historia clínica, acorde a lo establecido en el artículo 15 de la Ley 41/2002 básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos en materia de información y documentación clínica.

Conclusión sexta

Proponemos que el informe farmacogenético se contemple como una prestación sanitaria innovadora en el marco del artículo 14 de la Ley 11/2017 de Buen Gobierno y Profesionalización de la Gestión de los Centros y Organizaciones Sanitarias del Servicio Madrileño de Salud, así como en el marco de la Ley 16/2003 de cohesión y calidad asistencial del Sistema Nacional de Salud.

D. En relación con el Objetivo 4:

Conclusión séptima

El modelo de trabajo y de informe farmacogenético propuesto en pacientes en tratamiento con tamoxifeno, puede trasladarse a otras situaciones clínicas y terapéuticas vinculadas al análisis de polimorfismos del CYP2D6 con otros grupos farmacológicos, utilizados en terapéutica y dependientes metabólicamente de este citocromo.

Conclusión octava

El informe farmacogenético permite desarrollar un modelo de prestación sanitaria que permite optimizar el tratamiento, evitar y reducir efectos adversos, en el marco del ejercicio profesional de una nueva medicina personalizada y de precisión que se incorpora a los nuevos conceptos de humanización de la asistencia sanitaria.

9. REFERENCIAS

13. Hood L. Systems biology and p4 medicine: past, present, and future. *Rambam Maimonides Med J*. 2013 Apr;4(2): e0012.
14. Raimundo S, Toscano C, Klein K, Fischer J, Griesse E-U, Eichelbaum M, et al. A novel intronic mutation, 2988G>A, with high predictivity for impaired function of cytochrome P450 2D6 in white subjects. *Clin Pharmacol Ther*. 2004 Aug;76(2):128–38.
15. Dunnwald LK1, Rossing MA, Li Cl. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2007; 9 (1): R6.
16. Vera Álvarez, J.J. Factores Pronóstico del Cáncer de Mama. *Boletín Oncológico del Área Sanitaria de Teruel*, 2015; noviembre, nº 13.
17. Scriver CR. The salience of Garrod's "molecular groupings" and "Inborn Factors in Disease." *J Inherit Metab Dis*. 1989;12 Suppl 1:9–24.
18. Garrod AE. *The Lancet*. The incidence of alkaptonuria: a study in chemical individuality. *Nutr Rev*. 1975 Mar;33(3):81–3.
19. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. 1953 Apr 25;171(4356):737–8.
20. Clayman CB, Arnold J, Hockwald RS, Yount EH, Edgcomb JH, Alving AS. Toxicity of primaquine in Caucasians. *J Am Med Assoc*. 1952 Aug 23;149(17):1563–8.
21. Alving AS, Carson PE, Flanagan CL, Ickes CE. Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science*. 1956 Sep 14;124(3220):484–5.
22. Marcisin SR, Reichard G, Pybus BS. Primaquine pharmacology in the context of CYP 2D6 pharmacogenomics: Current state of the art. *Pharmacol Ther*. 2016 May; 161:1-10.
23. Hughes HB. On the metabolic fate of isoniazid. *J Pharmacol Exp Ther*. 1953 Dec;109(4):444–52.
24. Hughes HB, Biehl JP, Jones AP, Schmidt LH. Metabolism of isoniazid in man as related to the occurrence of peripheral neuritis. *Am Rev Tuberc*. 1954 Aug;70(2):266–73.
25. Blum M, Demierre A, Grant DM, Heim M, Meyer UA. Molecular mechanism of slow acetylation of drugs and carcinogens in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991 Jun 15;88 (12):5237–41.
26. Vatsis KP, Martell KJ, Weber WW. Diverse point mutations in the human gene for polymorphic N-acetyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991 Jul 15;88(14):6333–7.
27. Kalow W, Staron N. On distribution and inheritance of atypical forms of human serum cholinesterase, as indicated by dibucaine numbers. *Can J Biochem Physiol*. 1957 Dec; 35 (12):1305–20.
28. Lehmann H, Ryan E. The familial incidence of low pseudocholinesterase level. *Lancet*. 1956 Jul 21; 271 (6934):124.
29. Motulsky AG. Drug reactions enzymes, and biochemical genetics. *J Am Med Assoc*. 1957 Oct 19;165 (7):835–7.

30. Breast International Group (BIG) 1-98 Collaborative Group, Thürlimann B, Keshaviah A, Coates AS, Mouridsen H, Mauriac L, et al. A comparison of letrozole and tamoxifen in postmenopausal women with early breast cancer. *N Engl J Med*. 2005 Dec 29;353(26):2747–57.
31. Alexanderson B, Evans DA, Sjöqvist F. Steady-state plasma levels of nortriptyline in twins: influence of genetic factors and drug therapy. *Br Med J*. 1969 Dec 27; 4 (5686):764–8.
32. Vesell ES. Twin studies in pharmacogenetics. *Hum Genet Suppl*. 1978;(1):19–30.
33. Harper MJ, Walpole AL. Contrasting endocrine activities of cis and trans isomers in a series of substituted triphenylethylenes. *Nature*. 1966 Oct 1; 212 (5057):87.
34. Klopfer A, Hall M. New synthetic agent for the induction of ovulation: preliminary trials in women. *Br Med J*. 1971 Jan 16;1(5741):152-4.
35. Williamson JG, Ellis JD. The induction of ovulation by tamoxifen. *J Obstet Gynaecol Br Commonw*. 1973 Sep; 80 (9):844–7.
36. Korenman SG, Dukes BA. Specific estrogen binding by the cytoplasm of human breast carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 1970 May; 30(5): 639-45.
37. Cole MP, Jones CT, Todd ID. A new anti-oestrogenic agent in late breast cancer. An early clinical appraisal of ICI46474. *Br J Cancer*. 1971 Jun; 25(2):270–5.
38. Ward HW. Anti-oestrogen therapy for breast cancer: a trial of tamoxifen at two dose levels. *Br Med J*. 1973 Jan 6; 1 (5844):13-4.
39. Jordan VC. Tamoxifen: a most unlikely pioneering medicine. *Nat Rev Drug Discov*. 2003 Mar; 2 (3):205–13.
40. Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM, et al. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst*. 1998 Sep 16; 90 (18):1371–88.
41. Jordan VC, Allen KE. Evaluation of the antitumour activity of the non-steroidal antioestrogen monohydroxytamoxifen in the DMBA-induced rat mammary carcinoma model. *Eur J Cancer*. 1980 Feb ;16 (2):239–51.
42. Jordan VC, Collins MM, Rowsby L, Prestwich G. A monohydroxylated metabolite of tamoxifen with potent antioestrogenic activity. *J Endocrinol*. 1977 Nov; 75 (2):305–16.
43. Jordan VC, Dowse LJ. Tamoxifen as an anti-tumour agent: effect on oestrogen binding. *J Endocrinol*. 1976 Feb ; 68 (02): 297-303.
44. Jordan VC, Jaspan T. Tamoxifen as an anti-tumour agent: oestrogen binding as a predictive test for tumour response. *J Endocrinol*. 1976 Mar; 68(3):453-60.
45. Jordan VC, Koerner S. Tamoxifen as an anti-tumour agent: role of oestradiol and prolactin. *J Endocrinol*. 1976 Feb; 68(02): 305–11.
46. Jordan VC, Lababidi MK, Langan-Fahey S. Suppression of mouse mammary tumorigenesis by long-term tamoxifen therapy. *J Natl Cancer Inst*. 1991 Apr 3; 83(7):492–6.

47. Jordan VC, Phelps E, Lindgren JU. Effects of anti-estrogens on bone in castrated and intact female rats. *Breast Cancer Res. Treat.* 1987, Oct; 10(1):31-5.
48. Jordan VC. Effect of tamoxifen (ICI 46,474) on initiation and growth of DMBA-induced rat mammary carcinomata. *Eur J Cancer.* 1976 Jun; 12(6):419-24.
49. Kimura S, Umeno M, Skoda RC, Meyer UA, Gonzalez FJ. The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene, and a pseudogene. *Am J Hum Genet.* 1989 Dec; 45(6): 889-904.
50. Tapas Mukhopadhyay and Jack A. Roth. Silicone lubricant enhances recovery of nucleic acids after phenol-chloroform extraction. *Nucleic Acids Research*, 1993, Vol. 21, No 3, 781-782.
51. Griesse EU, Zanger UM, Brudermans U, Gaedigk A, Mikus G, Morike K et al. Assesment of the predictive power of genotypes for the in-vivo catalytic function of CYP2D6 in a German population. *Pharmacogenetics*, 1998, 8: 15-26.
52. Roberts, R.L. and Kennedy, M.A. Rapid detection of common cytochrome P450 2D6 alleles in Caucasians. *Clinica Chimica Acta*, 2006, 366: 348-351
53. Newton, C. R., Graham, A. and Heptinstall, L. E. (1989) Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucl Acids Res* 17, 2503-2516.
54. Dermer SJ1, Johnson EM. Rapid DNA analysis of alpha 1-antitrypsin deficiency: application of an improved method for amplifying mutated gene sequences. *Lab Invest.* 1988 Sep;59(3):403-8.
55. Little, Stephen. Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. *Current Protocols in Human Genetics*. 2001 May; Chapter 9: Unit 9.8.
56. Sachse C, Brockmöller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet.* 1997 Feb;60(2):284-95.
57. Raimundo S1, Toscano C, Klein K, Fischer J, Griesse EU, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM. A novel intronic mutation, 2988G>A, with high predictivity for impaired function of cytochrome P450 2D6 in white subjects. *Clin Pharmacol Ther.* 2004 Aug;76(2):128-38.
58. www.cypalleles.ki.se. The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database. CYP2 family: CYP2D6.
59. Clarke SE. In vitro assessment of human cytochrome P450. *Xenobiotica.* 1998 Dec; 28 (12): 1167-202.
60. Andersson T, Flockhart DA, Goldstein DB, Huang S-M, Kroetz DL, Milos PM, et al. Drug-metabolizing enzymes: evidence for clinical utility of pharmacogenomic tests. *Clin Pharmacol Ther.* 2005 Dec; 78 (6): 559-81.
61. Gaedigk A, Gotschall RR, Forbes NS, Simon SD, Kearns GL, Leeder JS. Optimization of cytochrome P4502D6 (CYP2D6) phenotype assignment using

- a genotyping algorithm based on allele frequency data. *Pharmacogenetics*. 1999 Dec; 9(6): 669-82.
62. Sachse C, Brockmöller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet*. 1997 Feb; 60(2): 284-95.
63. Gaedigk A. Complexities of CYP2D6 gene analysis and interpretation. *Int. Rev. Psychiatry*, 2013, 25, 534–553.
64. Menoyo A, del Rio E, Baiget M. Characterization of variant alleles of cytochrome CYP2D6 in a Spanish population. *Cell Biochem Funct*. 2006 Sep-Oct; 24(5): 381-5.
65. Beer B, Erb R, Pitterl F, Niederstätter H, Maroñas O, Gesteira A, Carracedo A, Piatkov I, Oberacher H. CYP2D6 genotyping by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2011, Jun; 400(8):2361-70.
66. Correia C, Santos P, Coutinho AM, Vicente AM. Characterization of pharmacogenetically relevant CYP2D6 and ABCB1 gene polymorphisms in a Portuguese population sample. *Cell Biochem Funct*. 2009, Jun; 27(4): 251-5.
67. Zhou Y, Ingelman-Sundberg M, Lauschke VM. Worldwide distribution of cytochrome P450 alleles: A meta-analysis of population-scale sequencing projects. *Clin Pharmacol Ther*. 2017, Apr 5.
68. Fernández-Santander A, Gaibar M, Novillo A, Romero-Lorca A, Rubio M, Chicharro LM, Tejerina A, Bandrés F. Relationship between Genotypes Sult1a2 and Cyp2d6 and Tamoxifen Metabolism in Breast Cancer Patients. *PLoS One*. 2013, Jul 29; 8(7).
69. Vera Álvarez, J.J. Factores Pronóstico del Cáncer de Mama. *Boletín Oncológico del Área Sanitaria de Teruel*, nº 13, noviembre 2015.
70. Dunnwald LK, Rossing MA, Li CI. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2007;9(1):R6.
71. Ratain MJ, Nakamura Y, Cox NJ. CYP2D6 genotype and tamoxifen activity: understanding interstudy variability in methodological quality. *Clin Pharmacol Ther*. 2013 Aug; 94(2):185-7.
72. Brauch H, Schroth W, Goetz MP, Mürdter TE, Winter S, Ingle JN, Schwab M, Eichelbaum M. Tamoxifen use in postmenopausal breast cancer: CYP2D6 matters. *J Clin Oncol*. 2013, Jan 10; 31(2): 176-80.
73. Brauch H, Schwab M. Prediction of tamoxifen outcome by genetic variation of CYP2D6 in post-menopausal women with early breast cancer. *Br J Clin Pharmacol*. 2014 Apr;77(4):695-703.
74. Schroth W, Winter S, Mürdter T, Schaeffeler E, Eccles D, Eccles B, Chowbay B, Khor CC, Tfayli A, Zgheib NK, Eichelbaum M, Schwab M, Brauch H. Improved Prediction of Endoxifen Metabolism by CYP2D6 Genotype in Breast Cancer Patients Treated with Tamoxifen. *Front Pharmacol*. 2017, Aug 24; 8:582.
75. Madlensky L, Natarajan L, Tchu S, Pu M, Mortimer J, Flatt SW, et al. Tamoxifen metabolite concentrations, CYP2D6 genotype, and breast cancer outcomes. *Clin Pharmacol Ther*. 2011 May; 89 (5): 718–25.

76. Maximov PY1, McDaniel RE, Fernandes DJ, Korostyshevskiy VR, Bhatta P, Mürdter TE, Flockhart DA, Jordan VC. Simulation with cells in vitro of tamoxifen treatment in premenopausal breast cancer patients with different CYP2D6 genotypes. *Br J Pharmacol*. 2014 Dec; 171(24): 5624-35.
77. Saladores P, Mürdter T, Eccles D, Chowbay B, Zgheib NK, Winter S, Ganchev B, Eccles B, Gerty S, Tfayli A, Lim JS, Yap YS, Ng RC, Wong NS, Dent R, Habbal MZ, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Schroth W, Schwab M, Brauch H. Tamoxifen metabolism predicts drug concentrations and outcome in premenopausal patients with early breast cancer. *Pharmacogenomics J*. 2015 Feb; 15(1): 84-94.
78. Irvin JrWJ, Walko CM, Weck KE, Ibrahim JG, Chiu WK, Dees EC et al. Genotype-guided tamoxifen dosing increases active metabolite exposure in women with reduced CYP2D6 metabolism: a multicenter study. *J Clin Oncol* 2011; 29: 3232–3239.
79. Kiyotani K, Mushiroda T, Imamura CK, Tanigawara Y, Hosono N, Kubo M et al. Dose-adjustment study of tamoxifen based on CYP2D6 genotypes in Japanese breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 131: 137-145.
80. Barginear MF, Jaremko M, Peter I, Yu C, Kasai Y, Kemeny M et al. Increasing tamoxifen dose in breast cancer patients based on CYP2D6 genotypes and endoxifen levels: effect on active metabolite isomers and the antiestrogenic activity score. *Clin Pharmacol Ther* 2011; 90: 605-611.
81. Dickschen K, Eissing T, Mürdter T, Schwab M, Willmann S. Overcoming CYP2D6-mediated tamoxifen resistance: phenotype-specific tamoxifen-endoxifen combinations. *Breast* 2013; 22: S86.
82. Ahmad A, Shahabuddin S, Sheikh S, Kale P, Krishnappa M, Rane RC et al. Endoxifen, a new cornerstone of breast cancer therapy: demonstration of safety, tolerability, and systemic bioavailability in healthy human subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2010; 88: 814-817.
83. Regan MM, Pagani O, Fleming GF, Walley BA, Price KN, Rabaglio M et al. Adjuvant treatment of premenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer: design of the TEXT and SOFT trials. *Breast* 2013; 22: 1094-1100.
84. Schroth W, Goetz MP, Hamann U, Fasching PA, Schmidt M, Winter S et al. Association Between CYP2D6 polymorphisms and outcomes among women with early stage breast cancer treated with tamoxifen. *JAMA* 2009; 302: 1429-1436.
85. Goetz MP, Suman VJ, Hoskin TL, Gnant M, Filipits M, Safgren SL et al. CYP2D6 metabolism and patient outcome in the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group trial (ABCSG) 8. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 500-507.
86. Province MA, Goetz MP, Brauch H, Flockhart DA, Hebert JM, Whaley R et al. CYP2D6 genotype and adjuvant tamoxifen: meta-analysis of heterogeneous study populations. *Clin Pharmacol Ther* 2013; 95: 216-227.
87. Kiyotani K, Mushiroda T, Imamura CK, Hosono N, Tsunoda T, Kubo M et al. Significant effect of polymorphisms in CYP2D6 and ABCC2 on clinical

- outcomes of adjuvant tamoxifen therapy for breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2010; 28:1287-1293.
88. Hertz DL, and Rae JM One step at a time: CYP2D6 guided tamoxifen treatment awaits convincing evidence of clinical validity. *Pharmacogenomics* 2016b, 17, 823-826.
 89. Mürdter TE, Schroth W, Bacchus-Gerybadze L, Winter S, Heinkele G, Simon W, et al. Activity levels of tamoxifen metabolites at the estrogen receptor and the impact of genetic polymorphisms of phase I and II enzymes on their concentration levels in plasma. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2011, 89, 708-717.
 90. Fox P, Balleine RL, Lee C, Gao B, Balakrishnar B, Menzies AM, et al. Dose escalation of tamoxifen in patients with low endoxifen level: evidence for therapeutic drug monitoring-the TADE study. *Clin. Cancer Res.* 2016, 22, 3164-3171.
 91. Crews KR, Gaedigk A, Dunnenberger HM, Leeder JS, Klein TE, Caudle KE, et al. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for cytochrome P450 2D6 genotype and codeine therapy: 2014 update. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2014, 95, 376-382.
 92. Gaedigk A, Simon SD, Pearce RE, Bradford LD, Kennedy MJ, and Leeder JS. The CYP2D6 activity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2008, 83, 234-242.
 93. Zhou SF. Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: part I. *Clin. Pharmacokinet*, 2009, 48, 689–723.
 94. Hertz DL, and Rae JM. Individualized tamoxifen dose escalation: confirmation of feasibility, question of utility. *Clin. Cancer Res.* 2016a, 22, 3121-3123.
 95. Teft, W. A., Gong, I. Y., Dingle, B., Potvin, K., Younus, J., Vandenberg, T. A., et al. CYP3A4 and seasonal variation in vitamin D status in addition to CYP2D6 contribute to therapeutic endoxifen level during tamoxifen therapy. *Breast Cancer Res. Treat.* 2013, 139, 95-105.
 96. Allen KE, Clark ER, Jordan VC. Evidence for the metabolic activation of non-steroidal antioestrogens: a study of structure-activity relationships. *Br J Pharmacol.* 1980; 71(1): 83–91.
 97. Borgna JL, Rochefort H. Hydroxylated metabolites of tamoxifen are formed in vivo and bound to estrogen receptor in target tissues. *J Biol Chem.* 1981 Jan 25; 256 (2): 859–68.
 98. Clarke R, Liu MC, Bouker KB, Gu Z, Lee RY, Zhu Y, et al. Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signaling. *Oncogene.* 2003 Oct 20; 22(47): 7316–39.
 99. Stearns V, Johnson MD, Rae JM, Morocho A, Novielli A, Bhargava P, et al. Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine. *J Natl Cancer Inst.* 2003 Dec 3;95(23):1758–64.
 100. Lee K-H, Ward BA, Desta Z, Flockhart DA, Jones DR. Quantification of tamoxifen and three metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to a clinical trial. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003; Jul 5;791(1-2):245-53.

101. Lien EA, Solheim E, Kvinnsland S, Ueland PM. Identification of 4-hydroxy-N-desmethyltamoxifen as a metabolite of tamoxifen in human bile. *Cancer Res.* 1988 Apr 15; 48(8): 2304-8.
102. Lien EA, Solheim E, Lea OA, Lundgren S, Kvinnsland S, Ueland PM. Distribution of 4-hydroxy-N-desmethyltamoxifen and other tamoxifen metabolites in human biological fluids during tamoxifen treatment. *Cancer Res.* 1989 Apr 15;49(8):2175-83.
103. Crewe HK, Ellis SW, Lennard MS, Tucker GT. Variable contribution of cytochromes P450 2D6, 2C9 and 3A4 to the 4-hydroxylation of tamoxifen by human liver microsomes. *Biochem Pharmacol.* 1997 Jan 24;53(2):171-8.
104. Desta Z, Ward BA, Soukhova NV, Flockhart DA. Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004 Sep; 310 (3):1062-75.
105. Ring A, Dowsett M. Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocr Relat Cancer.* 2004 Dec;11(4):643-58.
106. Rae JM. CYP2D6 genotype should not be used to determine endocrine therapy in postmenopausal breast cancer patients. *Clin Pharmacol Ther.* 2013 Aug;94(2):183-5.
107. Rae JM, Regan M, Leyland-Jones B, Hayes DF, Dowsett M. CYP2D6 genotype should not be used for deciding about tamoxifen therapy in postmenopausal breast cancer. *J Clin Oncol.* 2013, Jul 20; 31(21): 2753-5.
108. Abraham JE, Maranian MJ, Driver KE, Platte R, Kalmyrzaev B, Baynes C, Luccarini C, Shah M, Ingle S, Greenberg D, Earl HM, Dunning AM, Pharoah PD, Caldas C. CYP2D6 gene variants: association with breast cancer specific survival in a cohort of breast cancer patients from the United Kingdom treated with adjuvant tamoxifen. *Breast Cancer Res.* 2010; 12(4).
109. Goetz MP, Rae JM, Suman VJ, Safgren SL, Ames MM, Visscher DW, Reynolds C, Couch FJ, Lingle WL, Flockhart DA, Desta Z, Perez EA, Ingle JN. Pharmacogenetics of tamoxifen biotransformation is associated with clinical outcomes of efficacy and hot flashes. *J Clin Oncol.* 2005, 23: 9312-8.
110. Schroth W, Goetz MP, Hamann U, Fasching PA, Schmidt M, Winter S, Fritz P, Simon W, Suman VJ, Ames MM, Safgren SL, Kuffel MJ, Ulmer HU, Bolander J, Strick R, Beckmann MW, Koelbl H, Weinshilboum RM, Ingle JN, Eichelbaum M, Schwab M, Brauch H. Association between CYP2D6 polymorphisms and outcomes among women with early stage breast cancer treated with tamoxifen. *JAMA* 2009; 302: 1429-36.
111. Rae JM, Drury S, Hayes DF, Stearns V, Thibert JN, Haynes BP, Salter J, Sestak I, Cuzick J, Dowsett M. CYP2D6 and UGT2B7 genotype and risk of recurrence in tamoxifen-treated breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* 2012; 104: 452-60.
112. Regan MM, Leyland-Jones B, Bouzyk M, Pagani O, Tang W, Kammiller R, Dell'orto P, Biasi MO, Thurlimann B, Lyng MB, Ditzel HJ, Neven P, Debled M, Maibach R, Price KN, Gelber RD, Coates AS, Goldhirsch A, Rae JM, Viale G.

- CYP2D6 genotype and tamoxifen response in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: the breast international group 1-98 trial. *J Natl Cancer Inst*, 2012; 104: 441-51.
113. Stearns V, Johnson MD, Rae JM, Morocho A, Novielli A, Bhargava P, et al. Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine. *J Natl Cancer Inst*. 2003 Dec 3;95(23):1758-64.
 114. Crewe HK, Lennard MS, Tucker GT, Woods FR, Haddock RE. The effect of selective serotonin re-uptake inhibitors on cytochrome P4502D6 (CYP2D6) activity in human liver microsomes. *Br J Clin Pharmacol*. 1992 Sep; 34(3):262-5.
 115. Nowell SA, Ahn J, Rae JM et al. Association of genetic variation in tamoxifen-metabolizing enzymes with overall survival and recurrence of disease in breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat*. 2005, 91 (3), 249-258.
 116. Wegman P, Elingarami S, Carstensen J, Stal O, Nordenskjold B, Wingren S. Genetic variants of CYP3A5, CYP2D6, SULT1A1, UGT2B15 and tamoxifen response in postmenopausal patients with breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2007, 9(1), R7.
 117. Mahgoub A, Idle JR, Dring LG, Lancaster R, Smith RL. Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man. *Lancet*. 1977 Sep 17;2(8038):584-6.
 118. Eichelbaum M, Spannbrucker N, Steincke B, Dengler HJ. Defective N-oxidation of sparteine in man: a new pharmacogenetic defect. *Eur J Clin Pharmacol*. 1979 Sep;16(3):183-7.
 119. Gonzalez FJ, Skoda RC, Kimura S, Umeno M, Zanger UM, Nebert DW, et al. Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature*. 1988, Feb 4; 331(6155):442-6.
 120. Kahn GC, Boobis AR, Murray S, Brodie MJ, Davies DS. Assay and characterisation of debrisoquine 4-hydroxylase activity of microsomal fractions of human liver. *Br J Clin Pharmacol*. 1982 May;13(5):637-45.
 121. Meier PJ, Mueller HK, Dick B, Meyer UA. Hepatic monooxygenase activities in subjects with a genetic defect in drug oxidation. *Gastroenterology*. 1983 Sep;85(3):682-92.
 122. Distlerath LM, Reilly PE, Martin MV, Davis GG, Wilkinson GR, Guengerich FP. Purification and characterization of the human liver cytochromes P-450 involved in debrisoquine 4-hydroxylation and phenacetin O-deethylation, two prototypes for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J Biol Chem*. 1985, Jul 25;260(15):9057-67.
 123. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth Enzymol*. 1987; 155: 335-50.
 124. Kagimoto M, Heim M, Kagimoto K, Zeugin T, Meyer UA. Multiple mutations of the human cytochrome P450IID6 gene (CYP2D6) in poor metabolizers of debrisoquine. Study of the functional significance of individual mutations by expression of chimeric genes. *J Biol Chem*. 1990, Oct 5; 265(28): 17209-14.
 125. Gough AC, Miles JS, Spurr NK, Moss JE, Gaedigk A, Eichelbaum M, et al. Identification of the primary gene defect at the cytochrome P450 CYP2D locus. *Nature*. 1990, Oct 25;347(6295):773-6.

126. Masood E. As consortium plans free SNP map of human genome. *Nature*. 1999 Apr 15;398(6728):545-6.
127. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. 2001, Feb 15;409(6822):928-33.
128. Desta Z, Ward BA, Soukhova NV, Flockhart DA. Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004 Sep;310(3):1062-75.
129. Clarke SE. In vitro assessment of human cytochrome P450. *Xenobiotica*. 1998 Dec;28(12):1167-202.
130. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994 Jul; 270(1):414-23.
131. Court MH. A pharmacogenomics primer. *J Clin Pharmacol*. 2007 Sep;47(9):1087-103.
132. Coller JK, Krebsfaenger N, Klein K, Endrizzi K, Wolbold R, Lang T, et al. The influence of CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 genotypes on the formation of the potent antioestrogen Z-4-hydroxy-tamoxifen in human liver. *Br J Clin Pharmacol*. 2002 Aug;54(2):157-67.
133. Crewe HK, Notley LM, Wunsch RM, Lennard MS, Gillam EMJ. Metabolism of tamoxifen by recombinant human cytochrome P450 enzymes: formation of the 4-hydroxy, 4'-hydroxy and N-desmethyl metabolites and isomerization of trans-4-hydroxytamoxifen. *Drug Metab Dispos*. 2002 Aug;30(8):869-74.
134. Borges S, Desta Z, Li L, Skaar TC, Ward BA, Nguyen A, et al. Quantitative effect of CYP2D6 genotype and inhibitors on tamoxifen metabolism: implication for optimization of breast cancer treatment. *Clin Pharmacol Ther*. 2006 Jul; 80(1):61-74.
135. Goetz MP, Kamal A, Ames MM. Tamoxifen pharmacogenomics: the role of CYP2D6 as a predictor of drug response. *Clin Pharmacol Ther*. 2008 Jan;83(1):160-6.
136. Jin Y, Desta Z, Stearns V, Ward B, Ho H, Lee K-H, et al. CYP2D6 genotype, antidepressant use, and tamoxifen metabolism during adjuvant breast cancer treatment. *J Natl Cancer Inst*. 2005 Jan 5;97(1):30-9.
137. Fromson JM, Pearson S, Bramah S. The metabolism of tamoxifen (I.C.I. 46,474). II. In female patients. *Xenobiotica*. 1973 Nov; 3(11):711-4.
138. Fromson JM, Pearson S, Bramah S. The metabolism of tamoxifen (I.C.I. 46,474). I. In laboratory animals. *Xenobiotica*. 1973 Nov; 3(11):693-709.
139. Robertson DW, Katzenellenbogen JA, Long DJ, Rorke EA, Katzenellenbogen BS. Tamoxifen antiestrogens. A comparison of the activity, pharmacokinetics, and metabolic activation of the cis and trans isomers of tamoxifen. *J Steroid Biochem*. 1982 Jan;16(1):1-13.

140. Mauvais-Javis P, Baudot N, Castaigne D, Banzet P, Kuttenn F. trans-4-Hydroxytamoxifen concentration and metabolism after local percutaneous administration to human breast. *Cancer Res.* 1986 Mar;46(3):1521-5.
141. Sachse C, Brockmöller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet.* 1997 Feb; 60(2): 284-95.
142. Beverage JN, Sissung TM, Sion AM, Danesi R, Figg WD. CYP2D6 polymorphisms and the impact on tamoxifen therapy. *J Pharm Sci.* 2007 Sep;96(9): 2224–31.
143. Bradford LD. CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics.* 2002 Mar;3(2):229-43.
144. Fernández-Santander A, Gaibar M, Novillo A, Romero-Lorca A, Rubio M, Chicharro LM, et al. Relationship between genotypes Sult1a2 and Cyp2d6 and tamoxifen metabolism in breast cancer patients. *PLoS ONE.* 2013 ;8(7): e70183.
145. Lim JSL, Chen XA, Singh O, Yap YS, Ng RCH, Wong NS, et al. Impact of CYP2D6, CYP3A5, CYP2C9 and CYP2C19 polymorphisms on tamoxifen pharmacokinetics in Asian breast cancer patients. *Br J Clin Pharmacol.* 2011 May;71(5):737–50.
146. Gjerde J, Geisler J, Lundgren S, Ekse D, Varhaug JE, Mellgren G, et al. Associations between tamoxifen, estrogens, and FSH serum levels during steady state tamoxifen treatment of postmenopausal women with breast cancer. *BMC Cancer.* 2010; 10:313.
147. Johnson MD, Zuo H, Lee K-H, Trebley JP, Rae JM, Weatherman RV, et al. Pharmacological characterization of 4-hydroxy-N-desmethyl tamoxifen, a novel active metabolite of tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat.* 2004 May;85(2):151–9.
148. Fisher B, Costantino JP, Redmond CK, Fisher ER, Wickerham DL, Cronin WM. Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14. *J Natl Cancer Inst.* 1994 Apr 6;86(7):527–37.
149. McGuire WL. Steroid receptors in human breast cancer. *Cancer Res.* 1978 Nov; 38(11 Pt 2):4289–91.
150. Manni A, Trujillo JE, Marshall JS, Brodkey J, Pearson OH. Antihormone treatment of stage IV breast cancer. *Cancer.* 1979 Feb; 43(2):444–50.
151. Pritchard KI, Thomson DB, Myers RE, Sutherland DJ, Mobbs BG, Meakin JW. Tamoxifen therapy in premenopausal patients with metastatic breast cancer. *Cancer Treat Rep.* 1980 Jul;64(6-7):787–96.
152. Fisher B, Redmond C, Brown A, Fisher ER, Wolmark N, Bowman D, et al. Adjuvant chemotherapy with and without tamoxifen in the treatment of primary breast cancer: 5-year results from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Trial. *J Clin Oncol.* 1986 Apr;4(4):459–71.
153. Fisher B, Redmond C, Brown A, Wickerham DL, Wolmark N, Allegra J, et al. Influence of tumor estrogen and progesterone receptor levels on the response to tamoxifen and chemotherapy in primary breast cancer. *J Clin Oncol.* 1983 Apr;1(4):227–41.

154. Fisher B, Redmond C, Brown A, Wolmark N, Wittliff J, Fisher ER, et al. Treatment of primary breast cancer with chemotherapy and tamoxifen. *N Engl J Med*. 1981 Jul 2;305(1):1-6.
155. Jordan VC. Laboratory studies to develop general principles for the adjuvant treatment of breast cancer with antiestrogens: problems and potential for future clinical applications. *Breast Cancer Res Treat*. 1983;3 Suppl: S73-86.
156. Furr BJ, Jordan VC. The pharmacology and clinical uses of tamoxifen. *Pharmacol Ther*. 1984;25(2):127-205.
157. Iino Y, Wolf DM, Langan-Fahey SM, Johnson DA, Ricchio M, Thompson ME, et al. Reversible control of oestradiol-stimulated growth of MCF-7 tumours by tamoxifen in the athymic mouse. *Br J Cancer*. 1991 Dec;64(6):1019-24.
158. Gottardis MM, Jordan VC. Antitumor actions of keoxifene and tamoxifen in the N-nitrosomethylurea-induced rat mammary carcinoma model. *Cancer Res*. 1987 Aug 1;47(15):4020-4.
159. Love RR, Desta Z, Flockhart D, Skaar T, Ogburn ET, Ramamoorthy A, et al. CYP2D6 genotypes, endoxifen levels, and disease recurrence in 224 Filipino and Vietnamese women receiving adjuvant tamoxifen for operable breast cancer. *Springerplus*. 2013 Dec; 2(1): 52.
160. Love RR, Mazess RB, Barden HS, Epstein S, Newcomb PA, Jordan VC, et al. Effects of tamoxifen on bone mineral density in postmenopausal women with breast cancer. *N Engl J Med*. 1992 Mar 26;326(13): 852-6.
161. Cuzick J, Wang DY, Bulbrook RD. The prevention of breast cancer. *Lancet*. 1986 Jan 11;1(8472):83-6.
162. Fentiman IS, Powles TJ. Tamoxifen and benign breast problems. *Lancet*. 1987 Nov 7;2(8567):1070-2.
163. Jordan VC. What if tamoxifen (ICI 46,474) had been found to produce rat liver tumors in 1973? A personal perspective. *Ann Oncol*. 1995 Jan;6(1):29-34.
164. Greaves P, Goonetilleke R, Nunn G, Topham J, Orton T. Two-year carcinogenicity study of tamoxifen in Alderley Park Wistar-derived rats. *Cancer Res*. 1993 Sep 1;53(17):3919-24.
165. Hard GC, Iatropoulos MJ, Jordan K, Radi L, Kaltenberg OP, Imondi AR, et al. Major difference in the hepatocarcinogenicity and DNA adduct forming ability between toremifene and tamoxifen in female Crl:CD(BR) rats. *Cancer Res*. 1993 Oct 1;53(19):4534-41.
166. Fornander T, Rutqvist LE, Cedermark B, Glas U, Mattsson A, Silfverswärd C, et al. Adjuvant tamoxifen in early breast cancer: occurrence of new primary cancers. *Lancet*. 1989 Jan 21;1(8630):117-20.
167. Han XL, Liehr JG. Induction of covalent DNA adducts in rodents by tamoxifen. *Cancer Res*. 1992 Mar 1; 52(5):1360-3.
168. Rutqvist LE, Johansson H, Signomklao T, Johansson U, Fornander T, Wilking N. Adjuvant tamoxifen therapy for early stage breast cancer and second primary malignancies. Stockholm Breast Cancer Study Group. *J Natl Cancer Inst*. 1995 May 3;87(9):645-51.

169. Styles JA, Davies A, Lim CK, De Matteis F, Stanley LA, White IN, et al. Genotoxicity of tamoxifen, tamoxifen epoxide and toremifene in human lymphoblastoid cells containing human cytochrome P450s. *Carcinogenesis*. 1994 Jan;15(1):5-9.
170. Lim JSL, Chen XA, Singh O, Yap YS, Ng RCH, Wong NS, et al. Impact of CYP2D6, CYP3A5, CYP2C9 and CYP2C19 polymorphisms on tamoxifen pharmacokinetics in Asian breast cancer patients. *Br J Clin Pharmacol*. 2011 May;71(5):737-50.
171. Moorthy B, Sriram P, Pathak DN, Bodell WJ, Randerath K. Tamoxifen metabolic activation: comparison of DNA adducts formed by microsomal and chemical activation of tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen with DNA adducts formed in vivo. *Cancer Res*. 1996 Jan 1;56(1):53-7.
172. Powles TJ, Hardy JR, Ashley SE, Farrington GM, Cosgrove D, Davey JB, et al. A pilot trial to evaluate the acute toxicity and feasibility of tamoxifen for prevention of breast cancer. *Br J Cancer*. 1989, Jul; 60(1):126-31.
173. Pongracz K, Pathak DN, Nakamura T, Burlingame AL, Bodell WJ. Activation of the tamoxifen derivative metabolite E to form DNA adducts: comparison with the adducts formed by microsomal activation of tamoxifen. *Cancer Res*. 1995, Jul 15;55(14):3012-5.
174. Potter GA, McCague R, Jarman M. A mechanistic hypothesis for DNA adduct formation by tamoxifen following hepatic oxidative metabolism. *Carcinogenesis*. 1994 Mar;15(3):439-42.
175. Jensen EV, Jordan VC. The estrogen receptor: a model for molecular medicine. *Clin Cancer Res*. 2003 Jun; 9(6):1980-9.
176. Jordan VC, Brodie AMH. Development and evolution of therapies targeted to the estrogen receptor for the treatment and prevention of breast cancer. *Steroids*. 2007 Jan;72(1): 7-5.
177. Miller WR. Aromatase inhibitors: mechanism of action and role in the treatment of breast cancer. *Semin Oncol*. 2003 Aug;30(4 Suppl 14):3-11.
178. Howell A, Cuzick J, Baum M, Buzdar A, Dowsett M, Forbes JF, et al. Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet*. 2005 Jan 1;365(9453): 60-2.
179. Coombes RC, Hall E, Gibson LJ, Paridaens R, Jassem J, Delozier T, et al. A randomized trial of exemestane after two to three years of tamoxifen therapy in postmenopausal women with primary breast cancer. *N Engl J Med*. 2004 Mar 11;350(11):1081-92.
180. Goss PE, Ingle JN, Martino S, Robert NJ, Muss HB, Piccart MJ, et al. A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early-stage breast cancer. *N Engl J Med*. 2003 Nov 6;349(19):1793-802.
181. Baum M, Budzar AU, Cuzick J, Forbes J, Houghton JH, Klijn JGM, et al. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised trial. *Lancet*. 2002 Jun 22;359(9324):2131-9.

182. Lonning PE, Geisler J, Krag LE, Erikstein B, Bremnes Y, Hagen AI, et al. Effects of exemestane administered for 2 years versus placebo on bone mineral density, bone biomarkers, and plasma lipids in patients with surgically resected early breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005 Aug 1;23(22):5126–37.
183. Clarke M, Collins R, Darby S, Davies C, Elphinstone P, Evans V, Godwin J, Gray R, Hicks C, James S, MacKinnon E, McGale P, McHugh T, Peto R, Taylor C, Wang Y; Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005 Dec 17;366(9503):2087–106. Review.
184. Goetz MP, Knox SK, Suman VJ, Rae JM, Safgren SL, Ames MM, et al. The impact of cytochrome P450 2D6 metabolism in women receiving adjuvant tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat*. 2007 Jan;101(1):113–21.
185. Hawse JR, Subramaniam M, Cicek M, Wu X, Gingery A, Grygo SB, et al. Endoxifen's molecular mechanisms of action are concentration dependent and different than that of other anti-estrogens. *PLoS ONE*. 2013; 8(1): e54613.
186. Gong IY, Teft WA, Ly J, Chen Y-H, Alicke B, Kim RB, et al. Determination of clinically therapeutic endoxifen concentrations based on efficacy from human MCF7 breast cancer xenografts. *Breast Cancer Res Treat*. 2013 May;139 (1): 61–9.
187. Schroth W, Antoniadou L, Fritz P, Schwab M, Muerdter T, Zanger UM, et al. Breast cancer treatment outcome with adjuvant tamoxifen relative to patient CYP2D6 and CYP2C19 genotypes. *J Clin Oncol*. 2007 Nov 20;25(33):5187–93.
188. Wang D, Guo Y, Wrighton SA, Cooke GE, Sadee W. Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *Pharmacogenomics J*. 2011 Aug;11(4):274–86.
189. Binkhorst L, van Gelder T, Loos WJ, de Jongh FE, Hamberg P, Moghaddam-Helmantel IMG, et al. Effects of CYP induction by rifampicin on tamoxifen exposure. *Clin Pharmacol Ther*. 2012 Jul; 92(1):62–7.
190. Gryn SE, Teft WA, Kim RB. Profound reduction in the tamoxifen active metabolite endoxifen in a patient on phenytoin for epilepsy compared with a CYP2D6 genotype matched cohort. *Pharmacogenet Genomics*. 2014 Jul; 24(7):367–9.
191. Wilkinson GR. Drug metabolism and variability among patients in drug response. *N Engl J Med*. 2005 May 26;352(21):2211–21.
192. Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002, Nov 18;54(10):1271–94.
193. Roses AD. Pharmacogenetics and future drug development and delivery. *Lancet*. 2000, Apr 15;355(9212):1358–61.
194. Teunissen SF, Rosing H, Koornstra RHT, Linn SC, Schellens JHM, Schinkel AH, et al. Development and validation of a quantitative assay for the analysis of tamoxifen with its four main metabolites and the flavonoids daidzein, genistein and glycitein in human serum using liquid chromatography coupled with

- tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2009 Aug 15;877(24):2519–29.
195. Teunissen SF, Rosing H, Schinkel AH, Schellens JHM, Beijnen JH. Bioanalytical methods for determination of tamoxifen and its phase I metabolites: a review. *Anal Chim Acta*. 2010, Dec 17; 683(1): 21-37.
196. Hanioka N, Kimura S, Meyer UA, Gonzalez FJ. The human CYP2D locus associated with a common genetic defect in drug oxidation: a G1934----A base change in intron 3 of a mutant CYP2D6 allele results in an aberrant 3' splice recognition site. *Am J Hum Genet*. 1990 Dec; 47(6): 994-1001.
197. Osborne CK. Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med*. 1998, Nov 26;339(22):1609-18.
198. Bratherton DG, Brown CH, Buchanan R, Hall V, Kingsley Pillers EM, Wheeler TK, et al. A comparison of two doses of tamoxifen (Nolvadex) in postmenopausal women with advanced breast cancer: 10 mg bd versus 20 mg bd. *Br J Cancer*. 1984 Aug; 50(2):199–205.
199. Decensi A, Gandini S, Guerrieri-Gonzaga A, Johansson H, Manetti L, Bonanni B, et al. Effect of blood tamoxifen concentrations on surrogate biomarkers in a trial of dose reduction in healthy women. *J Clin Oncol*. 1999 Sep;17(9):2633-8.
200. Zafra-Ceres M1, de Haro T, Farez-Vidal E, Blancas I, Bandres F, de Dueñas EM, Ochoa-Aranda E, Gomez-Capilla JA, Gomez-Llorente C. Influence of CYP2D6 polymorphisms on serum levels of tamoxifen metabolites in Spanish women with breast cancer. *Int J Med Sci*. 2013 May 27;10(7):932-7.
201. Fernández-Santander A, Luna F, Santiago C, Rodríguez MT, Bandrés F, Ruiz JR, Lucia A, Gómez-Gallego F. CYP2D6 polymorphism screening in a selected population of Spain (La Alpujarra): no effect of geographical isolation. *Ann Hum Biol*. 2010 Apr;37(2):267-73.
202. Crescenti A1, Mas S, Gassó P, Baiget M, Bernardo M, Lafuente A. Simultaneous genotyping of CYP2D6*3, *4, *5 and *6 polymorphisms in a Spanish population through multiplex long polymerase chain reaction and minisequencing multiplex single base extension analysis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007 Oct;34(10):992-7.
203. Almoguera B1, Riveiro-Alvarez R, Gomez-Dominguez B, Lopez-Rodriguez R, Dorado P, Vaquero-Lorenzo C, Dal-Ré R, Fernandez-Piqueras J, Llerena A, Abad-Santos F, Ayuso C. Evaluating a newly developed pharmacogenetic array: screening in a Spanish population. *Pharmacogenomics*. 2010 Nov;11(11):1619-25.
204. Chin FW, Chan SC, Abdul Rahman S, Noor Akmal S, Rosli R. CYP2D6 Genetic Polymorphisms and Phenotypes in Different Ethnicities of Malaysian Breast Cancer Patients. *Breast J*. 2016 Jan-Feb;22(1):54-62.
205. Man M1, Farmen M, Dumauval C, Teng CH, Moser B, Irie S, Noh GJ, Njau R, Close S, Wise S, Hockett R. Genetic variation in metabolizing enzyme and transporter genes: comprehensive assessment in 3 major East Asian subpopulations with comparison to Caucasians and Africans. *J Clin Pharmacol*. 2010 Aug;50(8):929-40.

206. Khan BA, Robinson R, Fohner AE, Muzquiz LI, Schilling BD, Beans JA, Olnes MJ, Trawicki L, Frydenlund H, Laukes C, Beatty P, Phillips B, Nickerson D, Howlett K, Dillard DA, Thornton TA, Thummel KE, Woodahl EL. Cytochrome P450 Genetic Variation Associated with Tamoxifen Biotransformation in American Indian and Alaska Native People. *Clin Transl Sci*. 2018 Feb 13.
207. Zembutsu H, Nakamura S, Akashi-Tanaka S, Kuwayama T, Watanabe C, Takamaru T, Takei H, Ishikawa T, Miyahara K, Matsumoto H, Hasegawa Y, Kutomi G, Shima H, Satomi F, Okazaki M, Zaha H, Onomura M, Matsukata A, Sagara Y, Baba S, Yamada A, Shimada K, Shimizu D, Tsugawa K, Shimo A, Tan EY, Hartman M, Chan CW, Lee SC, Nakamura Y. Significant Effect of Polymorphisms in CYP2D6 on Response to Tamoxifen Therapy for Breast Cancer: A Prospective Multicenter Study. *Clin Cancer Res*. 2017 Apr 15;23(8):2019-2026.
208. Goetz MP, Sangkuhl K, Guchelaar HJ, Schwab M, Province M, Whirl-Carrillo M, Symmans WF, McLeod HL, Ratain MJ, Zembutsu H, Gaedigk A, van Schaik RH, Ingle JN, Caudle KE, Klein TE. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2D6 and Tamoxifen Therapy. *Clin Pharmacol Ther*. 2018 May;103(5):770-777.
209. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001 Feb 15;409(6822):860-921.
210. Roberts R, Sullivan P, Joyce P and Kennedy MA. Rapid and comprehensive Determination of cytochrome P450 CYP2D6 poor metabolizer genotypes by multiplex polymerase chain reaction. (2000) *Human mutation* 16: 77-85.
211. Mota P, Silva HC, Soares MJ, Pego A, Loureiro M, Cordeiro CR, Regateiro FJ. Genetic polymorphisms of phase I and phase II metabolic enzymes as modulators of lung cancer susceptibility. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015 May;141(5):851-60.
212. Pindurová E, Zourková A, Zrůstová J, Juřica J, Pavelka A. Alternative reliable method for cytochrome P450 2D6 poor metabolizers genotyping. *Mol Biotechnol*. 2013 Jan;53(1):29-40.
213. Hinrichs JW, Smallegoor WD, van Baalen-Benedek EH, Welker C, van der Weide J. Detection of CYP2D6 polymorphisms *9, *10, and *41 using ARMS-PCR and their allelic frequencies in 400 psychiatric patients. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45(4):555-7.
214. Fleeman N1, Martin Saborido C, Payne K, Boland A, Dickson R, Dundar Y, Fernández Santander A, Howell S, Newman W, Oyee J, Walley T. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of genotyping for CYP2D6 for the management of women with breast cancer treated with tamoxifen: a systematic review. *Health Technol Assess*. 2011 Sep;15(33):1-102.
215. Ramón y Cajal T1, Altés A, Paré L, del Río E, Alonso C, Barnadas A, Baiget M. Impact of CYP2D6 polymorphisms in tamoxifen adjuvant breast cancer treatment. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Jan;119(1):33-8.
216. Sukasem C1, Sirachainan E, Chamnanphon M, Pechatanan K, Sirisinha T, Ativitavas T, Panvichian R, Ratanatharathorn V, Trachu N, Chantratita W.

- Impact of CYP2D6 polymorphisms on tamoxifen responses of women with breast cancer: a microarray-based study in Thailand. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(9):4549-53.
217. Schroth W, Hamann U, Fasching PA, Dauser S, Winter S, Eichelbaum M, Schwab M, Brauch H. CYP2D6 polymorphisms as predictors of outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen: expanded polymorphism coverage improves risk stratification. *Clin Cancer Res*. 2010 Sep 1;16(17):4468-77.
218. Kiyotani K, Mushiroda T, Sasa M, Bando Y, Sumitomo I, Hosono N, Kubo M, Nakamura Y, Zembutsu H. Impact of CYP2D6*10 on recurrence-free survival in breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen therapy. *Cancer Sci*. 2008 May;99(5):995-9.
219. Lash TL, Ahern TP, Cronin-Fenton D, Garne JP, Hamilton-Dutoit S, Sørensen HT. Comment on 'Impact of CYP2D6*10 on recurrence-free survival in breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen therapy'. *Cancer Sci*. 2008 Aug;99(8):1706-7.
220. Lan B, Ma F, Zhai X, Li Q, Chen S, Wang J, Fan Y, Luo Y, Cai R, Yuan P, Zhang P, Li Q, Xu B. The relationship between the CYP2D6 polymorphisms and tamoxifen efficacy in adjuvant endocrine therapy of breast cancer patients in Chinese Han population. *Int J Cancer*. 2018 Jul 1;143(1):184-189.
221. Province MA, Altman RB, Klein TE. Interpreting the CYP2D6 results from the International Tamoxifen Pharmacogenetics Consortium. *Clin Pharmacol Ther*. 2014 Aug;96(2):144-6.
222. Teunissen SF, Rosing H., Schinkel AH, Schellens JHM and Beijnen JH (2010). Bioanalytical methods for determination of tamoxifen and its phase I metabolites: A review. *Analytica Chimica Acta* 683:21–37
223. Heath DD, Flat SW, Wu AH, Pruitt MA, Rock CL. Evaluation of tamoxifen and metabolites by LC-MS/MS and HPLC methods. *Br J Biomed Sci*. 2014;71(1):33-9.
224. Sanders JM1, Burka LT, Shelby MD, Newbold RR, Cunningham ML. Determination of tamoxifen and metabolites in serum by capillary electrophoresis using a nonaqueous buffer system. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1997 Jul 18; 695(1):181-5.
225. Lu W, Poon GK, Carmichael PL, Cole RB. Analysis of tamoxifen and its metabolites by on-line capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry employing nonaqueous media containing surfactants. *Anal Chem*. 1996 Feb 15;68(4):668-74.
226. Lim HK, Stellingweif S, Sisenwine S, Chan KW. Rapid drug metabolite profiling using fast liquid chromatography, automated multiple-stage mass spectrometry and receptor-binding. *J Chromatogr A*. 1999 Jan 29; 831(2):227-41.
227. Zhu YB, Zhang Q, Zou JJ, Yu CX, Xiao DW. Optimizing high-performance liquid chromatography method with fluorescence detection for quantification of tamoxifen and two metabolites in human plasma: application to a clinical study. *J Pharm Biomed Anal*. 2008 Jan 22; 46(2):349-55. Epub 2007 Oct 13.
228. Dezentjé VO, Opdam FL, Gelderblom H, Hartigh den J, Van der Straaten T, Vree R, Maartense E, Smorenburg CH, Putter H, Dieudonné AS, Neven P, Van de Velde CJ, Nortier JW, Guchelaar HJ. CYP2D6 genotype- and endoxifen-guided tamoxifen dose escalation increases endoxifen serum concentrations

- without increasing side effects. *Breast Cancer Res Treat.* 2015 Oct;153(3):583-90.
229. Mortimer JE, Flatt SW, Parker BA, Gold EB, Wasserman L, Natarajan L, Pierce JP; WHEL Study Group. Tamoxifen, hot flashes and recurrence in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2008 Apr;108(3):421-6.
230. Murdter TE, Schroth W, Bacchus-Gerybadze L, et al. Activity levels of tamoxifen metabolites at the estrogen receptor and the impact of genetic polymorphisms of phase I and II enzymes on their concentration levels in plasma. *Clin Pharmacol Ther* 2011; 89: 708–17.
231. Lim JS, Chen XA, Singh O, et al. Impact of CYP2D6, CYP3A5, CYP2C9 and CYP2C19 polymorphisms on tamoxifen pharmacokinetics in Asian breast cancer patients. *Br J Clin Pharmacol* 2011; 71: 737-50.
232. Mwinyi J, Vokinger K, Jetter A, et al. Impact of variable CYP genotypes on breast cancer relapse in patients undergoing adjuvant tamoxifen therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2014; 73: 1181- 8.
233. Binkhorst L, van Gelder T, Loos WJ, et al. Effects of CYP induction by rifampicin on tamoxifen exposure. *Clin Pharmacol Ther* 2012; 92: 62-7.
234. Fernandez-Santander A, Gaibar M, Novillo A, et al. Relationship between genotypes Sult1A2 and Cyp2d6 and tamoxifen metabolism in breast cancer patients. *PLoS One* 2013;8: e70183.
235. Lee Hood. A Personal Journey of Discovery: Developing Technology and Changing Biology. *Annual Review of Analytical Chemistry.* February 27, 2008; 1: 1 - 43.
236. Hood L, Heath JR, Phelps ME, Lin B. 2004. Systems biology and new technologies enable predictive and preventative medicine. *Science* 306: 640-43.
237. Weston AD, Hood L. 2004. Systems biology, proteomics, and the future of healthcare: toward predictive, preventative, and personalized medicine. *J. Proteome Res.* 3: 179 – 96.

Referencias normativas:

1. Directiva 65/65/CEE del Consejo, de 26 de enero de 1965, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas, sobre especialidades farmacéuticas. Diario Oficial Comunidades Europeas, 9 de febrero de 1965, 13/Vol. 01, 18-22.
2. Directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 6 de noviembre de 2001 por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos para uso humano. Diario Oficial de Comunidades Europeas L311, 28 de noviembre de 2001, pag. 67-127.
3. Ley 25/1990, de 20 de diciembre, del Medicamento. Boletín Oficial del Estado núm. 306, sábado 22 de diciembre de 1990, pág. 38228-38246.
4. Real Decreto 561/1993, de 16 de abril, por el que se establecen los requisitos para la realización de ensayos clínicos con medicamentos. Boletín Oficial del Estado núm. 114, jueves 13 mayo 1993, pag. 14346-14364.
5. Directiva 2001/20/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 4 de abril de 2001, relativa a la aproximación sobre la aplicación de buenas prácticas clínicas en la realización de ensayos clínicos de medicamentos de uso humano. Diario Oficial de las Comunidades Europeas de 1 mayo de 2001, nº L121, pág. 34-44.
6. Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos. Boletín Oficial del Estado núm. 33, de 7 febrero 2004.
7. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Adoptada por la 18ª Asamblea Médica Mundial. Helsinki. Finlandia junio de 1964 y posteriores revisiones hasta 2013. www.wma.net
8. Instrumento de Ratificación del Convenio para la protección de los derechos humanos y la dignidad del ser humano con respecto a las aplicaciones de la Biología y la Medicina (Convenio relativo a los derechos humanos y la biomedicina), Oviedo el 4 de abril de 1997. Boletín Oficial del Estado núm.251, miércoles 20 octubre 1999, pág. 36825-36830.
9. Directiva 2004/27/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de marzo de 2004, que modifica la Directiva 2001/83/CE por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos de uso humano. Diario Oficial de la Unión Europea, nº L136, de 30 abril 2004, pág. 34-57.
10. Ley 29/2006, de 26 de julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. Boletín Oficial del Estado núm. 178, jueves 27 julio 2006, pág. 28122-28165.
11. Reglamento (CE) nº726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de marzo 2004, por el que se establecen procedimientos comunitarios para la autorización y el control de los medicamentos de uso humano y veterinario y por el que se crea la Agencia Europea de Medicamentos. Diario Oficial de la Unión Europea, nº L136, de 30 abril de 2004, pág. 1-33.

12. Reglamento (UE) N° 536/2014 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de abril de 2014, sobre los ensayos clínicos de medicamentos de uso humano, y por el que se deroga la Directiva 2001/20/CE. Diario Oficial de la Unión Europea, n° L158, de 27 mayo de 2014, pág. 1-76.
13. Ley 28/2009, de 30 de diciembre, de modificación de la Ley 29/2006, de 26 de julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios.
14. Ley 10/2013, de 24 de julio, por la que se incorporan al ordenamiento jurídico español las Directivas 2010/84/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de diciembre de 2010, sobre farmacovigilancia, y 2011/62/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 8 de junio de 2011, sobre prevención de la entrada de medicamentos falsificados en la cadena de suministro legal, y se modifica la Ley 29/2006, de 26 de julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios.
15. Directiva 2010/84/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de diciembre de 2010 que modifica, en lo que respecta a la farmacovigilancia, la Directiva 2001/83/CE por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos para uso humano.
16. Directiva 2011/62/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 8 de junio de 2011 que modifica la Directiva 2001/83/CE por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos de uso humano, en lo relativo a la prevención de la entrada de medicamentos falsificados en la cadena de suministro legal.
17. Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios.
18. Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica. Boletín Oficial del Estado núm. 159, miércoles 4 julio 2007, pág. 28826-28848.
19. Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de abril de 2016, relativo a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales y a la libre circulación de estos datos y por el que se deroga la Directiva 95/46/CE (Reglamento general de protección de datos).
20. Carta de los derechos fundamentales de la Unión Europea (2000/C 364/01). Diario Oficial de las Comunidades Europeas; C 364/1; 18.12.2000.
21. Manual de Ética y Deontología Médica. Consejo General de Colegios Oficiales de Médicos. Organización Médica Colegial (OMC).
22. Ley 16/2003, de 28 de mayo, de cohesión y calidad del Sistema Nacional de Salud. BOE núm. 128, de 29 de mayo de 2003.
23. Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica. BOE núm. 274, de 15 de noviembre de 2002. Texto consolidado con última modificación: 22 de septiembre 2015.

24. LEY 11/2017, de 22 de diciembre, de Buen Gobierno y Profesionalización de la Gestión de los Centros y Organizaciones Sanitarias del Servicio Madrileño de Salud. Boletín Oficial de la Comunidad de Madrid núm. 2; 3 de enero de 2018.

Referencias páginas web:

1. www.emea.europa.eu European Medicines Agency.
2. www.seom.org Sociedad Española de Oncología Médica.
3. www.globocan.iarc.fr International Agency for Research on Cancer.
4. www.cypalleles.ki.se European Consortium CYP450.
5. www.pharmvar.org Pharmacogene Variation Consortium.
6. www.chem.nlm.nih.gov/chemidplus ChemIDplus a TOXNET Database.
7. www.wma.net World Medical Association Medical Ethics Manual.
8. www.agpd.es Agencia Española de Protección de Datos.
9. www.ine.es Instituto Nacional de Estadística.
10. www.biblioteca.ucm.es Biblioteca Universidad Complutense.
11. www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed Citations for biomedical literature.